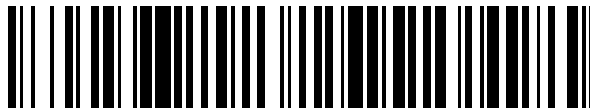


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 010**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2007 E 07804929 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2044103**

54 Título: **Péptidos que imitan epítomos protectores sin reactividad cruzada en seres humanos del polisacárido capsular de meningococo del grupo B**

30 Prioridad:

15.06.2006 GB 0611914

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

18.07.2014

73 Titular/es:

**TETI, GIUSEPPE (50.0%)
Department of Pathology and, Experimental
Microbiology, University of Messina, Torre
Biologica II piano, Policlinico, Via Consolare
Valeria 1
98125 Messina, IT y
FELICI, FRANCO (50.0%)**

72 Inventor/es:

FELICI, FRANCO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 478 010 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).

Péptidos que imitan epítomos protectores sin reactividad cruzada en seres humanos del polisacárido capsular de meningococo del grupo B.

Descripción

5

CAMPO TÉCNICO

10 La presente invención se encuentra en el campo de los patógenos bacterianos, en concreto la invención se refiere a péptidos que inducen actividad funcional contra *Neisseria meningitidis* serogrupo B y también carecen de actividad autoinmunitaria. La invención también se refiere a métodos de obtención y utilización de los péptidos de la invención.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 *Neisseria meningitidis* es una bacteria encapsulada clasificada en diferentes serogrupos en base a la composición química y a las características inmunitarias del polisacárido capsular (CP; 1). Los aislados humanos están casi totalmente representados por 5 serogrupos (A, B, C, Y y W135). No se dispone en general de ninguna vacuna para prevenir las infecciones causadas por cepas del serotipo B, que a menudo representan más que la mitad de los casos de enfermedad meningocócica en los países desarrollados (2). Los principales obstáculos para el desarrollo de vacunas basadas en la cápsula son la escasa inmunogenicidad del polisacárido capsular del grupo B (MenB CP), incluso después de la conjugación a proteínas, y las preocupaciones sobre la inducción de autoanticuerpos (3). Estas características están probablemente relacionados con la identidad estructural entre el polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* grupo B y el ácido polisialílico humano (PSA), que consisten en ácido N-acetilneuramínico unido mediante enlace alfa 2-8. Resulta obvio que la producción de una vacuna segura y eficaz contra MenB sería particularmente deseable. Los estudios que utilizan anticuerpos monoclonales han definido dos clases diferentes de epítomos capsulares presentes de forma natural en la superficie meningocócica (4, 5, 6). Una clase presenta reactividad cruzada con el PSA humano, mientras que la otra no presenta reactividad cruzada y es protectora. Moe *et al.* (FEMS Immunol Med Microbiol, 1999, 26(3-4):209-26) describen el uso de anticuerpos monoclonales anticapsulares para identificar miméticos moleculares de MenB CP a partir de bibliotecas de péptidos de presentación en fagos.

20 Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar más y mejores composiciones inmunogénicas para proporcionar inmunidad contra *Neisseria meningitidis*. Es un objeto adicional de la invención proporcionar péptidos que imiten las características antigénicas de los epítomos capsulares presentes de forma natural en la superficie meningocócica que no presenten reactividad cruzada y sean protectores.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 Los autores de la invención han identificado péptidos que imitan las características antigénicas de epítomos MenB CP que no presentan reactividad cruzada con el PSA humano ("epítomos protectores sin reactividad cruzada en seres humanos"). Por lo tanto, la presente invención se refiere a miméticos peptídicos de epítomos únicos de MenB CP. Los anticuerpos inducidos por estos péptidos no se unen al ácido polisialílico en los tejidos del hospedador como se determina mediante los ensayos de autorreactividad descritos en el presente documento, y por tanto proporcionan un método seguro y eficaz para la prevención frente a MenB. Además, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican los miméticos peptídicos de la presente invención y a métodos para utilizarlos en la inmunización con ácidos nucleicos.

30 Por consiguiente, en una forma de realización, la presente invención se refiere a un mimético molecular de un epítomo de MenB, en la que dicho mimético es un péptido que no presenta reactividad cruzada con el PSA humano. El péptido puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 y 3. En otra forma de realización, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención. Preferentemente, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18, 19, 22 y 23.

35 En otra forma de realización, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas tales como vacunas, que comprenden los polipéptidos o ácidos nucleicos de la presente invención en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 La invención también proporciona un método para proteger a un paciente de la infección por MenB, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de la invención.

45 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido o ácido nucleico de la presente invención, para uso en medicina.

50 En otra forma de realización, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido o ácido nucleico de la presente invención, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un paciente en el

que la respuesta inmunitaria protege, por ejemplo, frente a la infección por MenB.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere al uso de un ácido nucleico de la presente invención como sensibilizador y al uso de un polipéptido de la presente invención como refuerzo, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un paciente en la que la respuesta inmunitaria protege, por ejemplo, frente a la infección por MenB.

Polipéptidos

Los polipéptidos de la invención pueden comprender las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 1 ó 3.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender secuencias de aminoácidos que tienen identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos descritas en los ejemplos. Dependiendo de la secuencia concreta, el grado de identidad de secuencia es preferentemente superior a un 50% (por ejemplo, un 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% o más). Estos polipéptidos incluyen homólogos, ortólogos, variantes alélicas y mutantes. La identidad entre polipéptidos se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se aplica en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda de huecos afines con parámetros de *penalización por apertura de hueco* = 12 y *penalización por extensión* de hueco = 1.

Estos polipéptidos pueden incluir, en comparación con las SEQ ID NO 1 - 13, uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc.) sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir, sustituciones de un aminoácido con otro que tiene una cadena lateral relacionada. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos, es decir, aspartato, glutamato; (2) básicos, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polares, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. Además, los polipéptidos pueden tener una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 etc.) deleciones de aminoácidos únicas con respecto a una secuencia de referencia. Además, los polipéptidos pueden incluir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 etc.) inserciones (por ejemplo, cada una de 1, 2 ó 3 aminoácidos) con respecto a una secuencia de referencia.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender fragmentos de las SEQ ID NO 1 a 13. Los fragmentos deben comprender al menos *n* aminoácidos consecutivos de las secuencias y, dependiendo de la secuencia concreta, *n* es 5 o más (por ejemplo, 6, 7 u 8).

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse de muchas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química (en su totalidad o en parte), mediante digestión de polipéptidos más largos utilizando proteasas, mediante la traducción a partir de ARN, mediante purificación a partir de cultivo celular (por ejemplo, de expresión recombinante), etc. Un método preferente para la producción de péptidos <40 aminoácidos de longitud implica la síntesis química *in vitro* [7,8]. Resulta especialmente preferente la síntesis de péptidos en fase sólida, tal como los métodos basados en la química tBoc o Fmoc [9]. También puede utilizarse, en parte o en su totalidad, la síntesis enzimática [10]. Como alternativa a la síntesis química, puede utilizarse la síntesis biológica, por ejemplo, pueden producirse polipéptidos mediante traducción. Esto puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. Los métodos biológicos están limitados en general a la producción de polipéptidos basados en L-aminoácidos, pero puede utilizarse la manipulación de la maquinaria de traducción (por ejemplo, de moléculas de aminoacil ARNt) para permitir la introducción de D-aminoácidos (o de otros aminoácidos no naturales, tales como yodotirosina o metilfenilalanina, azidohomoalanina, etc.) [11]. Sin embargo, cuando se incluyen D-aminoácidos, resulta preferente utilizar la síntesis química. Los polipéptidos de la invención pueden tener modificaciones covalentes en el extremo C-terminal y/o N-terminal.

Los polipéptidos de la invención puede adoptar diversas formas (por ejemplo, nativa, fusiones, glicosilada, no glicosilada, lipidada, no lipidada, fosforilada, no fosforilada, miristoilada, no miristoilada, monomérica, multimérica, particulada, desnaturalizada, etc.).

Los polipéptidos de la invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada es decir, sustancialmente libres de otros polipéptidos (por ejemplo, libres de polipéptidos naturales), y tienen generalmente al menos aproximadamente un 50% de pureza (en peso), y por lo general al menos aproximadamente un 90% de pureza, es decir, menos de aproximadamente un 50%, y más preferentemente menos de aproximadamente un 10% (por ejemplo, un 5% o menos) de una composición está compuesta por otros polipéptidos expresados.

Los polipéptidos de la invención pueden estar fijados a un soporte sólido. Los polipéptidos de la invención pueden comprender un marcador detectable (por ejemplo, un marcador radiactivo o fluorescente, o un marcador de biotina).

El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser

lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. El término también abarca un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcado. También quedan incluidos dentro de la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, los aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

La invención proporciona polipéptidos que comprenden una o más secuencias -XY- o -YX- o -XX-, en las que: -X- es una secuencia de aminoácidos como se ha definido anteriormente e -Y- no es una secuencia tal como se ha definido anteriormente, es decir, la invención proporciona proteínas de fusión. Por ejemplo, la invención proporciona -X₁-Y₁-X₂-Y₂-, o X₁-X₂-Y₁- o -X₁-X₂- etc. En una forma de realización de la invención, Y es una secuencia líder N-terminal como se observa por ejemplo, en la SEQ ID NO 14 ó 15. En otra forma de realización, Y es una secuencia de T cooperador C-terminal como se observa por ejemplo, en la SEQ ID NO 16 ó 17.

En el presente documento se describe un proceso para producir los polipéptidos de la invención, que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora de la invención en condiciones que induzcan la expresión del polipéptido.

En el presente documento se describe un procedimiento para producir un polipéptido de la invención, en el que el polipéptido se sintetiza en parte o en su totalidad utilizando medios químicos.

Diseño de fármacos y peptidomiméticos

Los polipéptidos de la invención son útiles para proporcionar inmunidad contra MenB por sí mismos. Sin embargo, pueden purificarse para mejorar su actividad (ya sea general o específica) o para mejorar características farmacológicamente importantes, tales como la biodisponibilidad, la toxicología, el metabolismo, la farmacocinética, etc. Por lo tanto, los polipéptidos pueden utilizarse como compuestos candidatos para una posterior investigación y purificación.

Los polipéptidos de la invención pueden utilizarse para diseñar moléculas peptidomiméticas [por ejemplo, referencias 12 a 17]. Estas serán por lo general isostéricas con respecto a los polipéptidos de la invención, pero carecerán de uno o más de sus enlaces peptídicos. Por ejemplo, la cadena principal del péptido puede sustituirse por una cadena principal no peptídica conservando al mismo tiempo las cadenas laterales de aminoácidos importantes.

La molécula peptidomimética puede comprender aminoácidos de azúcar [18]. Pueden utilizarse peptoides.

Para facilitar el diseño de moléculas peptidomiméticas, puede definirse para los péptidos un farmacóforo (es decir, un grupo de características químicas y limitaciones tridimensionales que expresa las características específicas responsables de la actividad). El farmacóforo incluye preferentemente características accesibles desde la superficie, incluidos más preferentemente aceptadores y donantes de enlaces de hidrógeno, grupos encargados/ionizables, y/o parches hidrófobos. Estos pueden ponderarse en función de su importancia relativa en la actividad que confieren [19].

Los farmacóforos puede determinarse utilizando un software tal como CATALYST (incluido HypoGen o HipHop) [20], CERIU², o puede construirlos uno mismo a partir de una conformación conocida de un polipéptido de la invención. El farmacóforo puede utilizarse para cribar bibliotecas estructurales, utilizando un programa como CATALYST. También puede utilizarse el programa CLIX [21], que busca orientaciones de moléculas candidatas en bases de datos estructurales que producen la máxima coincidencia espacial con grupos químicos que interactúan con el receptor.

El farmacóforo o la superficie de unión pueden utilizarse para mapear posiciones de interacción favorables para grupos funcionales (por ejemplo, protones, grupos hidroxilo, grupos amino, grupos hidrófobos) o pequeños fragmentos de moléculas. A continuación, pueden diseñarse compuestos *de novo* en los que los grupos funcionales pertinentes se localicen en sustancialmente la misma relación espacial que en los polipéptidos de la invención.

Los grupos funcionales pueden unirse en un único compuesto utilizando fragmentos puente con el tamaño y la geometría correctos o armazones que puedan soportar los grupos funcionales en orientaciones favorables, proporcionando de este modo un compuesto peptidomimético según la invención. Mientras que unir los grupos funcionales de esta manera puede hacerse de forma manual, tal vez con la ayuda de un software tal como QUANTA o SYBYL, también se dispone de enfoques de diseño *de novo* automatizados o semi-automatizados, tales como:

- MCSS/HOOK [22, 23, 20], que une múltiples grupos funcionales con los moldes moleculares tomados de una base de datos.

- LUDI [24, 20], que calcula los puntos de interacción que idealmente serían satisfechos por un ligando, coloca los fragmentos en el sitio de unión en base a su capacidad para interactuar con el receptor y, a continuación, los conecta para producir un ligando.
- 5 – MCDLNG [25], que llena un sitio de unión al receptor con una matriz compacta de átomos genéricos y utiliza un procedimiento de Monte Carlo para modificar aleatoriamente los tipos de átomos, las posiciones, las disposiciones de los enlaces y otras propiedades.
- 10 – GROW [26], que se inicia con un fragmento "semilla" inicial (colocado manual o automáticamente) y hace crecer el ligando hacia el exterior.
- 15 – SPROUT [27], conjunto que incluye módulos para: identificar enlaces de hidrógeno favorables y regiones hidrófobas dentro de un bolsillo de unión (módulo HIPPO); seleccionar grupos funcionales y colocarlos en los sitios diana para formar fragmentos de partida para la generación de la estructura (EleFAnT); generar esqueletos que satisfagan las restricciones estéricas del bolsillo de unión haciendo crecer fragmentos espaciadores sobre los fragmentos de inicio y a continuación conectar los esqueletos parciales resultantes (SPIDeR); sustituir los heteroátomos en los esqueletos para generar moléculas con las propiedades electroestáticas que sean complementarias de las del sitio receptor (MARABOU). Las soluciones pueden agruparse y puntuarse mediante el módulo ALLigaTOR.
- 20 – CAVEAT [28], que diseña unidades de enlace para limitar las moléculas acíclicas.
- 25 – LEAPFROG [29], que evalúa ligandos realizando pequeños cambios estructurales escalonados y evaluando rápidamente la energía de unión del nuevo compuesto. Los cambios se mantienen o se descartan en base a la energía de unión modificada, y las estructuras evolucionan para aumentar la energía de interacción con el receptor.
- 30 – GROUPBUILD [30], que utiliza una biblioteca de moldes orgánicos comunes y una completa descripción de campo de fuerzas empíricas de las interacciones no enlazantes entre un ligando y el receptor para construir ligandos que tengan una estructura químicamente razonable y con propiedades estéricas y electroestáticas complementarias del sitio de unión al receptor.
- RASSE [31]

35 Estos métodos identifican compuestos pertinentes. Estos compuestos pueden diseñarse *de novo*, pueden ser compuestos conocidos o pueden basarse en compuestos conocidos. Los compuestos pueden ser útiles por sí mismos o pueden ser prototipos que pueden utilizarse para una posterior purificación farmacéutica (es decir, compuestos candidatos) con el fin de mejorar la afinidad de unión u otras características farmacológicamente importantes (por ejemplo, la biodisponibilidad, la toxicología, el metabolismo, la farmacocinética, etc.).

40 Además de ser compuestos útiles individualmente, los ligandos identificados *in silico* mediante las técnicas de diseño en base a la estructura también pueden utilizarse para sugerir bibliotecas de compuestos para los métodos de cribado "tradicionales" *in vitro* o *in vivo*. Pueden identificarse motivos farmacéuticos importantes en los ligandos e imitarse en las bibliotecas de compuestos (por ejemplo, bibliotecas combinatorias) para el cribado de la actividad pertinente.

45 **Ácidos nucleicos**

50 La invención también proporciona ácido nucleico que codifica los polipéptidos de la invención. El ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO 18, 19, 22 y 23.

55 En el presente documento también se describe ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos que tienen identidad de secuencia con tales secuencias de nucleótidos. La identidad entre secuencias se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se ha descrito anteriormente. Dependiendo de la secuencia concreta, el grado de identidad de secuencia es preferentemente superior a un 50% (por ejemplo, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% o más).

60 La invención proporciona ácido nucleico de fórmula 5'-X-Y-Z-3', 5'-X-Y-3', 5'-Y-Z-3', en la que: -X- es una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 35, 36) que codifica una secuencia líder de la SEQ ID NO 14 ó 15; -Z- es una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 37, 38) que codifica una secuencia de T cooperador de la SEQ ID NO 16, 17; e -Y- es una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 18, 19, 22 y 23.

65 En el presente documento también se describe ácido nucleico que comprende secuencias complementarias

de estas secuencias (por ejemplo, para antisentido o sondeo, o para su uso como cebadores).

El ácido nucleico según la invención puede adoptar diversas formas (por ejemplo, monocatenaria, bicatenaria, vectores, cebadores, sondas, marcado, etc.). Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser circulares o ramificados, pero generalmente serán lineales. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier forma de realización de la invención que utilice un ácido nucleico puede utilizar tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que componen la forma bicatenaria. Los cebadores y las sondas son generalmente monocatenarios, al igual que los ácidos nucleicos antisentido.

Los ácidos nucleicos de la invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada, es decir, sustancialmente libre de otros ácidos nucleicos (por ejemplo, libres de ácidos nucleicos naturales), teniendo generalmente al menos aproximadamente un 50% de pureza (en peso), y por lo general al menos aproximadamente un 90% de pureza.

El ácido nucleico de la invención puede estar fijado a un soporte sólido (por ejemplo, una perla, placa, filtro, película, diapositiva, soporte de micromatriz, resina, etc.) El ácido nucleico de la invención puede estar marcado, por ejemplo, con un marcador radiactivo o fluorescente, o un marcador de biotina. Esto es particularmente útil cuando el ácido nucleico va a utilizarse en técnicas de detección, por ejemplo en las que el ácido nucleico es un cebador o una sonda.

La expresión "ácido nucleico" incluye en términos generales una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que contiene desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Incluye ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN. También incluye análogos de ADN o ARN, tales como los que contienen cadenas principales modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o fosforotioatos) o bases modificadas. Por lo tanto, la invención incluye ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADN, ADNc, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, sondas, cebadores, etc. Cuando el ácido nucleico de la invención adopta la forma de ARN, puede tener o no una caperuza 5'.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse de muchas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química (al menos en parte), mediante digestión de ácidos nucleicos más largos mediante nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), uniendo ácidos nucleicos más cortos (por ejemplo, mediante ligasas o polimerasas), a partir de bibliotecas de ADNc o genómico, etc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser parte de un vector, es decir, parte de un constructo de ácido nucleico diseñado para la transducción/transfección de uno o más tipos de células. Los vectores pueden ser, por ejemplo, "vectores de clonación" que están diseñados para el aislamiento, la propagación y la replicación de los nucleótidos insertados, "vectores de expresión" que están diseñados para la expresión de una secuencia de nucleótidos en una célula hospedadora, "vectores virales" que están diseñados para dar como resultado la producción de un virus recombinante o una partícula pseudoviral, o "vectores lanzadera", que comprenden los atributos de más de un tipo de vector. Los vectores preferentes son plásmidos. Una "célula hospedadora" incluye un cultivo celular o una célula individual que puede ser o ha sido un receptor de ácido nucleico exógeno. Las células hospedadoras incluyen la progenie de una única célula hospedadora, y la progenie puede no ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula parental original debido a cambio y/o mutación natural, accidental o deliberada. Las células hospedadoras incluyen células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con el ácido nucleico de la invención.

Cuando un ácido nucleico sea ADN, se entenderá que "U" en una secuencia de ARN estará sustituido por "T" en el ADN. Del mismo modo, cuando un ácido nucleico sea ARN, se entenderá que "T" en una secuencia de ADN estará sustituido por "U" en el ARN.

El término "complemento" o "complementario" cuando se utiliza con relación a los ácidos nucleicos se refiere al apareamiento de bases de Watson-Crick. Por lo tanto, el complemento de C es G, el complemento de G es C, el complemento de A es T (o U) y el complemento de T (o U) es A. También es posible utilizar bases tales como I (la purina inosina), por ejemplo, para complementar las pirimidinas (C o T). Los términos también implican una dirección - el complemento de 5'-ACAGT-3' es 5'-ACTGT-3' más que 5'-TGTCA-3'.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden utilizarse, por ejemplo: para producir polipéptidos; como sondas de hibridación para la detección de ácido nucleico en muestras biológicas; para generar copias adicionales de los ácidos nucleicos; para generar ribozimas u oligonucleótidos antisentido; como cebadores o sondas de ADN monocatenario; o como oligonucleótidos que forman cadenas triples.

En el presente documento también se describe un proceso para producir el ácido nucleico de la invención, en el que el ácido nucleico se sintetiza en parte o en su totalidad utilizando medios químicos.

La invención proporciona vectores que comprenden secuencias de nucleótidos de la invención (por ejemplo, vectores de clonación o de expresión) y células hospedadoras transformadas con tales vectores.

Inmunización con ácidos nucleicos

La inmunización con ácidos nucleicos es en la actualidad un campo desarrollado (por ejemplo, véanse las referencias 32 a 39, etc.), y se ha aplicado a las vacunas contra *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, referencia 40).

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención se expresa *in vivo* después de la introducción en un paciente y, a continuación, el polipéptido expresado estimula el sistema inmunitario. Por lo general, el principio activo adoptará la forma de vector de ácido nucleico que comprende: (i) un promotor; (ii) una secuencia que codifica el polipéptido, unida operativamente al promotor; y opcionalmente (iii) un marcador seleccionable. Los vectores preferentes pueden comprender adicionalmente (iv) un origen de replicación; y (v) un terminador de la transcripción cadena abajo de y unido operativamente a (ii). En general, (i) y (v) serán eucariotas y (iii) y (iv) serán procariotas.

Los promotores preferentes son promotores virales, por ejemplo, de citomegalovirus (CMV). El vector también puede incluir secuencias reguladoras de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) además del promotor y que interactúan funcionalmente con el promotor. Los vectores preferentes incluyen el promotor/potenciador temprano inmediato de CMV, y los vectores más preferentes también incluyen el intrón A de CMV. El promotor está unido operativamente a una secuencia cadena abajo que codifica un polipéptido de la invención, de manera que la expresión de la secuencia que codifica el polipéptido quede bajo el control del promotor.

Cuando se utiliza un marcador, éste actúa preferentemente en un hospedador microbiano (por ejemplo, en un procariota, en una bacteria, en una levadura). El marcador es preferentemente un marcador seleccionable procariota (por ejemplo, transcrito bajo el control de un promotor procariota). Por razones prácticas, los marcadores típicos son genes de resistencia a antibióticos.

El vector de la invención es preferentemente un vector extracromosómico o episómico de replicación autónoma, tal como un plásmido.

El vector de la invención comprende preferentemente un origen de replicación. Resulta preferente que el origen de replicación sea activo en procariotas, pero no en eucariotas.

Por tanto, los vectores preferentes incluyen un marcador procariota para la selección del vector, un origen de replicación procariota, pero un promotor *eucariota* para activar la transcripción de la secuencia que codifica el polipéptido. Por lo tanto, los vectores, (a) se amplificarán y seleccionarán en hospedadores procariotas y sin la expresión del polipéptido, pero (b) se expresarán en hospedadores eucariotas sin ser amplificados. Esta disposición es ideal para los vectores de inmunización con ácidos nucleicos.

El vector de la invención puede comprender una secuencia eucariota de terminación de la transcripción cadena abajo de la secuencia codificante. Esto puede mejorar los niveles de transcripción. Cuando la secuencia codificante no tiene la suya propia, el vector de la invención comprende preferentemente una secuencia de poliadenilación. Una secuencia de poliadenilación preferente proviene de la hormona de crecimiento bovina.

El vector de la invención puede comprender un sitio de clonación múltiple.

Además de las secuencias que codifican el polipéptido de la invención y un marcador, el vector puede comprender una segunda secuencia codificante eucariota. El vector también puede comprender un IRES cadena arriba de dicha segunda secuencia con el fin de permitir la traducción de un segundo polipéptido eucariota a partir del mismo transcrito que el polipéptido de la invención. Como alternativa, la secuencia que codifica el polipéptido de la invención puede estar cadena abajo de un IRES.

El vector de la invención puede comprender motivos CpG no metilados, por ejemplo, secuencias no metiladas de ADN que tienen en común una citosina que precede a una guanosina, flanqueadas por dos purinas en 5' y dos pirimidinas en 3'. En su forma no metilada estos motivos de ADN han demostrado ser potentes estimuladores de varios tipos de células inmunitarias.

Los vectores pueden introducirse de manera dirigida. Las técnicas de introducción de ADN mediadas por receptor se describen, por ejemplo, en las referencias 41 a 46. Las composiciones terapéuticas que contienen un ácido nucleico se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden utilizarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 mg y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Factores tales como el método de acción (por ejemplo, para potenciar o inhibir los niveles del producto génico codificado) y la eficacia de la transformación y expresión son consideraciones que influirán en la dosificación requerida para la eficacia final. Cuando se desee una mayor expresión en un mayor área de tejido, se volverán a administrar las mismas cantidades o cantidades mayores de vector en un protocolo sucesiva de administraciones, o pueden ser necesarias varias administraciones en partes de tejido adyacentes o cercanas diferentes para lograr un resultado terapéutico positivo. En todos los casos, la experimentación de rutina en

ensayos clínicos determinará los intervalos específicos para un efecto terapéutico óptimo.

Los vectores pueden introducirse mediante vehículos de introducción de genes. El vehículo de introducción de genes puede ser de origen viral o no viral (véanse en general las referencias 47 a 50).

Los vectores basados en virus para la introducción de un ácido nucleico deseado y la expresión en una célula deseada son bien conocidos en la técnica. Los vehículos ejemplares basados en virus incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (por ejemplo, referencias 51 a 61), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus de Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532); también pueden utilizarse híbridos de estos virus), vectores de poxvirus (por ejemplo, vaccinia, de la viruela aviar, de la viruela del canario, vaccinia Ankara modificado, etc.), vectores de adenovirus y vectores de virus adenoasociado (AAV) (por ejemplo, véanse las referencias 62 a 67). También puede emplearse la administración de ADN unido a adenovirus muertos [68].

También pueden emplearse métodos y vehículos de introducción no virales, incluidos, pero no limitados a, ADN condensado policatiónico unido o no unido a adenovirus muerto solo [por ejemplo, 68], ADN unido a ligado [69], células de vehículos de introducción de células eucariotas [por ejemplo, referencias 70 a 74] y neutralización de la carga nucleica o fusión con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. En las referencias 75 y 76 se describen métodos ejemplares de introducción de ADN desnudo. En las referencias 77 a 81 se describen liposomas (por ejemplo, Inmunoliposomas) que pueden actuar como vehículos de introducción de genes. En las referencias 82 y 83 se describen enfoques adicionales.

La introducción no viral adecuada adicional para su uso incluye sistemas de introducción mecánicos tales como el enfoque descrito en la referencia 83. Por otra parte, la secuencia codificante y el producto de expresión de la misma pueden introducirse a través de la deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados o el uso de radiación ionizante [por ejemplo, referencias 84 y 85]. Otros métodos convencionales para la introducción de genes que pueden utilizarse para introducir la secuencia codificante incluyen, por ejemplo, el uso de pistola manual de partículas de transferencia de genes [86] o el uso de radiación ionizante para la activación de los genes transferidos [84 y 87].

La introducción de ADN utilizando micropartículas de PLG {poli(lactida-co-glicolida)} es un método especialmente preferente, por ejemplo mediante adsorción a las micropartículas, que se tratan opcionalmente para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, tratadas con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, tratadas con un detergente catiónico, tal como CTAB).

Composiciones farmacéuticas y usos

La invención proporciona composiciones que comprenden: (a) un polipéptido y/o ácido nucleico de la invención; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden ser adecuadas como composiciones inmunogénicas, por ejemplo, o como reactivos de diagnóstico, o como vacunas. Las vacunas según la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero serán por lo general profilácticas. El uso profiláctico incluye situaciones en las que se espera un contacto con MenB y en las que debe prevenirse el establecimiento de la infección. Por ejemplo, la composición puede administrarse antes de una cirugía.

El componente (a) es el principio activo de la composición, y se encuentra presente en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano y/o la supervivencia en un paciente, y preferentemente una cantidad suficiente para eliminar la infección bacteriana. La cantidad eficaz precisa para un paciente determinado dependerá de su tamaño y salud, la naturaleza y el grado de infección, y la composición o combinación de composiciones seleccionadas para la administración. La cantidad eficaz puede determinarse mediante experimentación de rutina y queda a criterio del médico. Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz será generalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, o de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg o de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas a base de polipéptidos y ácidos nucleicos son bien conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden incluirse en la composición en forma de sales y/o ésteres.

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier excipiente que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los excipientes adecuados son por lo general macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Tales excipientes son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras del pH, y similares. Un excipiente típico es la solución salina fisiológica tamponada con fosfato, estéril, libre de pirógenos. En la referencia 88 se dispone de un análisis minucioso de los

excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente si se envasan en un formato multidosis.

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

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

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

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

Los polipéptidos de la invención pueden administrarse junto con otros inmunorreguladores. En concreto, las composiciones incluirán por lo general un adyuvante de vacuna. Los adyuvantes que pueden utilizarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia 89], o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso de fosfato), adoptando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y resultando preferente la adsorción a la(s) sal(es). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como partícula de sal metálica [90].

Pueden incluirse sales de aluminio en las vacunas de la invención, de manera que la dosis de Al^{3+} se encuentre entre 0,2 mg y 1,0 mg por dosis.

Un adyuvante de fosfato de aluminio típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+} /ml. Puede utilizarse la adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo, entre 50 μg y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis. Cuando se utiliza un fosfato de aluminio y no se desea adsorber un antígeno al adyuvante, esto se favorece incluyendo iones fosfato libres en solución (por ejemplo, utilizando un tampón de fosfato).

B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5%, formulados en partículas submicrométricas utilizando un microfluidizador) [Capítulo 10 de la referencia 89; véanse también las referencias 91-93]. Se utiliza MF59 como adyuvante en la vacuna de subunidades trivalente contra el virus de gripe FLUAD™.

Los adyuvantes especialmente preferentes para uso en las composiciones son emulsiones submicrométricas de aceite en agua. Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua preferentes para uso en el presente documento son emulsiones de escualeno/agua, que contiene opcionalmente distintas cantidades de MTP-PE, tales como una emulsión submicrométrica de aceite en agua que contiene escualeno al 4%-5% p/v, Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán) al 0,25%-1,0% p/v y/o Span 85 (trioleato de sorbitán) al 0,25%-1,0%, y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE). En las referencias 91 y 94-95 se describen detalladamente emulsiones submicrométricas de aceite en agua, métodos para fabricarlas e inmunoadyuvantes, tales como péptidos de muramilo, para su uso en las composiciones.

También pueden utilizarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvantes en la invención.

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la referencia 89]

También pueden utilizarse formulaciones de saponina como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, tallos, raíces e incluso las flores de una gran variedad de especies vegetales. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse en el mercado de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonaria). Las formulaciones con adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como los ISCOM.

Se han purificado composiciones de saponina utilizando HPLC y RP-HPLC. Mediante estas técnicas, se han identificado fracciones purificadas específicas, incluidas QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la referencia 96 se describe un método de producción de QS21. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol [97].

Pueden utilizarse combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimuladores (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia 89]. Los ISCOM incluyen por lo general también un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede utilizarse en los ISCOM cualquier saponina conocida. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las referencias 97-99. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente(s) adicional(es) [100].

Puede encontrarse una revisión del desarrollo de los adyuvantes a base de saponina en las referencias 101 y 102.

D. Virusomas y partículas pseudovirales

También pueden utilizarse virusomas y partículas pseudovirales (VLP) como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus, opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente no son patógenos, no se replican y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse por recombinación o aislarse a partir de virus enteros. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virusomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la influenza (tal como HA o NA), virus de la hepatitis B (tal como proteínas del núcleo o de la cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la fiebre aftosa, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposon Ty). Las VLP se analizan adicionalmente en las referencias 103-108. Los virusomas se analizan adicionalmente, por ejemplo, en la referencia 109.

E. Derivados bacterianos o microbianos

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

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En la referencia 110 se describe una forma de "partícula pequeña" preferente del monofosforil lípido A 3 des-O-acilado. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 μ m [110]. Otros derivados no tóxicos de LPS incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato, por ejemplo, RC-529 [111, 112].

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tal como OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las referencias 113 y 114.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida mediante un enlace fosfato a una guanósina). Los oligonucleótidos y ARN bicatenarios que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también han demostrado ser inmunoestimuladores.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones con fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 115, 116 y 117 describen las posibles sustituciones análogas, por ejemplo, la sustitución de guanósina con 2'-desoxi-7-desazaguanósina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las referencias 118-123.

La secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [124]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se analizan en las referencias 125-127. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' quede accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden fijarse dos secuencias de oligonucleótidos CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 124 y 128-130.

5 Pueden utilizarse toxinas de ribosilación de ADP bacterianas y derivados detoxificados de las mismas como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se obtiene a partir de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación de ADP detoxificadas como adyuvantes para administración por vía mucosa se describe en la referencia 131 y como adyuvantes para administración parenteral en la referencia 132. La toxina o el toxoide está preferentemente en forma de holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las referencias 133-140. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas de ribosilación de ADP establecidos en la referencia 141.

F. Inmunomoduladores humanos

20 Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [142], etc.) [143], interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

25 También pueden utilizarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [144] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También puede utilizarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención [145].

H. Micropartículas

35 También pueden utilizarse micropartículas como adyuvantes en la invención. Resultan preferentes las micropartículas (es decir, una partícula de ~ 100 nm a ~ 150 μ m de diámetro, más preferentemente de ~ 200 nm a ~ 30 μ m de diámetro y lo más preferentemente de ~ 500 nm a ~ 10 μ m de diámetro) formadas a partir de materiales biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α -hidroxi ácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido), tratadas opcionalmente para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (capítulos 13 y 14 de la referencia 89)

40 En las referencias 146-148 se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

50 Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [149]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol [150], así como tensioactivos de éster o éteres de polioxietilenaquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [151]. Los éteres de polioxietileno preferentes están seleccionados del siguiente grupo: éter de polioxietilen-9-laurilo (laureth 9), éter de polioxietilen-9-estearilo, éter de polioxietilen-8-estearilo, éter de polioxietilen-4-laurilo, éter de polioxietilen-35-laurilo y éter de polioxietilen-23-laurilo.

K. Polifosfaceno (PCPP)

55 Se describen formulaciones de PCPP, por ejemplo en las referencias 152 y 153.

L. Péptidos de muramilo

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

M. Compuestos de imidazoquinolona.

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (e. g. "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las referencias 154 y 155.

5

N. Compuestos de tiosemicarbazona.

Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como los métodos de formulación, fabricación y cribado de todos los compuestos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la referencia 156. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como TNF- α .

10

O. Compuestos de tripatrina

Los ejemplos de compuestos de tripatrina, así como los métodos de formulación, fabricación y cribado de todos los compuestos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la referencia 157. Los compuestos de tripatrina son particularmente eficaces en la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como TNF- α .

15

20

La invención también puede comprender combinaciones de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, pueden utilizarse las siguientes combinaciones como composiciones de adyuvantes en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [158]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) [159]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [160]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [161]; (6) SAF, que contiene escualano al 10%, Tween 80TM al 0,4%, polímero de bloque plurónico L121 al 5%, y thr-MDP, microfluidizados en una emulsión submicrométrica o agitados en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula; (7) sistema adyuvante RibitTM (RAS), (Ribit Immunochem) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2%, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y el esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxTM); (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (como 3dMPL); y (9) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunestimulador (como una secuencia de nucleótidos que incluya un motivo CpG).

25

30

35

En el capítulo 7 de la referencia 89 se describen otras sustancias que actúan como inmunestimuladores.

El uso de un hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio como adyuvante es especialmente preferente, y los antígenos se adsorben generalmente a estas sales. El fosfato de calcio es otro adyuvante preferente.

40

El pH de las composiciones de la invención se encuentra preferentemente entre 6 y 8, preferentemente aproximadamente 7. Puede mantenerse el pH estable utilizando un tampón. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, resulta preferente utilizar un tampón de histidina [162]. La composición puede ser estéril y/o estar libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

45

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

50

Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiple. Para las formas multidosis, resultan preferentes los viales frente a las jeringas precargadas. Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de manera rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

55

Cuando una composición de la invención va a prepararse de manera extratempórea antes de su uso (por ejemplo, cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta en forma de kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa precargada y un vial, utilizándose el contenido de la jeringa para reactivar el contenido del vial antes de la inyección.

60

Las composiciones inmunogénicas utilizadas como vacunas comprenden una cantidad inunitariamente eficaz de antígeno(s), así como cualquier otro componente, según resulte necesario. "Cantidad inunitariamente eficaz" se refiere a que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo del estado físico y de salud del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate,

65

etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica por parte del médico tratante, y otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad se encuentre dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina, y una cantidad típica de cada antígeno sacárido meningocócico por dosis se encuentra entre 1 µg y 10 mg por antígeno.

El paciente es preferentemente un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o un niño.

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

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

El tratamiento de dosificación puede ser un régimen monodosis o un régimen multidosis. Pueden utilizarse dosis múltiples en un programa de vacunación primaria y/o en un programa de vacunación de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede ir seguido de un programa de dosis de refuerzo. El ácido nucleico de la presente invención puede utilizarse como sensibilizador seguido de un polipéptido de la presente invención como refuerzo. Los tiempos adecuados entre las dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la sensibilización y el refuerzo, puede determinarse de manera rutinaria.

Componentes antigénicos adicionales de las composiciones de la invención

La invención también proporciona una composición que comprende un polipéptido de la invención y uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- un antígeno sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y (preferentemente los cuatro), tal como el oligosacárido descrito en la referencia 163 del serogrupo C [véase también la referencia 164] o los oligosacáridos de la referencia 165.
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 166, 167, 168].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, como el virus inactivado [por ejemplo, 169, 170].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o de la nucleocápside [por ejemplo, 170, 171].
- un antígeno diftérico, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, el capítulo 3 de la referencia 172] por ejemplo, el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo, 173].
- un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, el capítulo 4 de la referencia 172].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o los aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, referencias 174 y 175].
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 164].
- antígeno(s) de la polio [por ejemplo, 176, 177], tal como IPV.
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo, los capítulos 9, 10 y 11 de la referencia 172].
- antígeno(s) de influenza [por ejemplo, el capítulo 19 de la referencia 172], tal como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 178].
- un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B).
- un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) [por ejemplo, 179, 180].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) [por ejemplo, 180, 181, 182].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 183].

Pueden detoxificarse antígenos proteicos tóxicos cuando resulte necesario (por ejemplo, detoxificación de toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [175]).

Cuando se incluye en la composición un antígeno de difteria, resulta preferente incluir también antígeno tetánico y antígenos de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno tetánico resulta preferente incluir también antígenos diftéricos y de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis resulta preferente incluir también antígenos diftéricos y tetánicos. Por lo tanto, resultan preferentes las combinaciones de DTP.

Los antígenos sacáridos se encuentran preferentemente en forma de conjugados. Las proteínas transportadoras para los conjugados incluyen toxinas bacterianas (tales como el toxoide diftérico o el toxoide

tetánico), la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [184], péptidos sintéticos [185,186], proteínas de choque térmico [187,188], proteínas de pertussis [189,190], la proteína D de *H. influenzae* [191,192], citocinas [193], linfocinas [193], proteínas de *H. influenzae*, hormonas [193], factores de crecimiento [193], toxina A o B de *C. difficile* [194], proteínas de captación de hierro [195], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos provenientes de patógenos [196], tal como la proteína N19 [197], proteína de superficie neumocócica PspA [198], neumolisina [199], etc. Una proteína transportadora preferente es la proteína CRM197 [200].

Los antígenos en la composición estarán presentes por lo general a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno determinado será suficiente para inducir una respuesta inmunitaria contra ese antígeno.

Como alternativa al uso de antígenos de proteínas en las composiciones inmunogénicas de la invención, puede utilizarse un ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de plásmido) que codifique el antígeno.

Los antígenos se adsorben preferentemente a una sal de aluminio.

General

La expresión "que comprende" abarca "incluido", 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" con relación a un valor numérico x se refiere, por ejemplo, a $x \pm 10\%$.

El término "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando resulte necesario, el término "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Como se ha indicado en el texto anterior, los ácidos nucleicos y polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir secuencias que:

- (a) son idénticas (es decir, idénticas al 100%) a las secuencias descritas en el listado de secuencias;
- (b) comparten identidad de secuencia con las secuencias descritas en el listado de secuencias;
- (c) tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 alteraciones de aminoácidos o nucleótidos individuales (deleciones, inserciones, sustituciones), que pueden estar en lugares separados o pueden ser contiguos, en comparación con las secuencias de (a) o (b); y
- (d) cuando se alinean con una secuencia concreta del listado de secuencias utilizando un algoritmo de alineamiento por pares, una ventana móvil de x monómeros (aminoácidos o nucleótidos) que se desplaza desde el comienzo (extremo N-terminal ó 5') hasta el final (extremo C-terminal ó 3'), de manera que para un alineamiento que se prolonga hasta p monómeros (donde $p > x$) existen $p-x+1$ de tales ventanas, cada ventana tiene al menos $x \cdot y$ monómeros alineados idénticos, donde: x está seleccionado de entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, y está seleccionado de entre 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y si $x \cdot y$ no es un número entero, entonces se redondea al número entero más próximo. El algoritmo de alineamiento por pares preferente es el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch [201], utilizando los parámetros por defecto (por ejemplo, con una Penalización por apertura de hueco = 10,0, y con una Penalización por extensión de hueco = 0,5, utilizando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo se aplica convenientemente en la herramienta *needle* en el paquete EMBOSS [202].

Los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención pueden tener además secuencias adicionales al extremo N-terminal/5'y/o C-terminal/3' de estas secuencias (a) a (d).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, los métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas están explicadas íntegramente en la literatura. Véanse, por ejemplo, las referencias 203-210, etc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la unión de clones de fagos a Seam 3. Las placas se sensibilizaron con un AcMo dirigido contra el pg3 (1 µg/ml) y se añadieron 100 µl de clones de fagos purificados (10^{11} ufp/ml). Después de 2 horas de incubación se añadió el AcMo Seam 3 (5 µg/ml) en presencia (columnas grises) o en ausencia (columnas estampadas) de MenB CP (1 µg/ml). La unión se detectó utilizando anti-IgG de ratón conjugado con AP. Los datos representan las medias ± DE de tres determinaciones.

La **Figura 2** muestra el análisis de citometría de flujo. Se muestra la unión del AcMO Seam 3 a células COS-7 permeabilizadas transfectadas con plásmidos de expresión que contenían los minigenes de p7m o p9M. Como controles se utilizaron las células transfectadas con el vector vacío (pCI-neo). Después de transfectarse de manera transitoria, se permeabilizaron las células con Tween 20 y se expusieron al AcMO Seam 3 (4 µg/ml en PBS). Para detectar la unión se utilizó anti-IgG de ratón conjugado con FITC.

La **Figura 3** muestra la actividad bactericida sérica después de la inmunización con el minigen de 7M. Se evaluó la actividad bactericida en los sueros de ratones inmunizados con diferentes plásmidos que contenían la secuencia de 7M o con un vector vacío (pCI-neo). Se administraron i.m. los plásmidos (150 µg) tres veces y se recogió suero el día 56 después de la primera inmunización. Para calcular la media geométrica de los títulos (barras horizontales), se dio a los sueros sin actividad bactericida detectable un título arbitrario de 4,5 (es decir, la mitad de la inversa de la dilución más baja ensayada). Para una descripción de los diferentes plásmidos véase la Tabla Dos. $P < 0,05$ = significativamente diferente mediante ANOVA y prueba de Student-Newman-Keuls.; ns = no significativo.

La **Figura 4** muestra la actividad bactericida sérica inducida mediante inmunización con 9M. Se evaluó la actividad bactericida en los sueros de ratones inmunizados con diferentes plásmidos que contenían la secuencia de 9M o con un vector vacío (pCI-neo). Se administraron i.m. los plásmidos (150 µg) tres veces y se recogió el suero el día 56 después de la primera inmunización. Para la comparación, se inmunizó a un grupo de animales tres veces i.p. con el péptido 9M conjugado con KLH (9M-KLH, 100 µg) utilizando adyuvante de Freund. En algunos experimentos se co-administraron a los ratones 70 µg de plásmidos que contenían las secuencias de 7M (pT.7M.), de IFN-γ (pmlFN) o de IL-12 (pmlL12), o las combinaciones indicadas, además del plásmido pT.9M (70 µg). Para calcular la media geométrica de los títulos (barras horizontales), se dio a los sueros sin actividad bactericida detectable un título arbitrario de 4,5 (es decir, la mitad de la inversa de la dilución más baja ensayada). Para una descripción de los diferentes plásmidos véase la Tabla Dos. $P < 0,05$ = significativamente diferente mediante ANOVA y prueba de Student-Newman-Keuls.; ns = no significativo.

La **Figura 5** muestra que la inmunización con el plásmido 9M induce anticuerpos específicos contra la cápsula. El panel de la izquierda muestra la inhibición de la actividad bactericida por conjugados 9M-KLH o MenB CP N-propionilado purificados. KLH hizo de control. Se mezcló el suero de un animal inmunizado con pT.9M+pmlFN-γ con los inhibidores y se ensayó a una dilución final de 1:100. El eje vertical muestra el número de bacterias una vez terminado el ensayo bactericida. Se muestra un experimento representativo de tres, cada uno llevado a cabo en una muestra de suero diferente obtenida de animales inmunizados con pT.9M+pmlFN-γ(gamma). Las muestras se seleccionaron del experimento que se muestra en la Fig. 4. El panel central muestra la actividad bactericida frente a diferentes cepas de meningococo utilizando los sueros anteriormente mencionados de animales inmunizados con pT.9M+pmlFN-γ(gamma). Las columnas y las barras representan las medias+DE. El panel de la derecha muestra la reactividad contra el ácido polisialílico humano utilizando las mismas tres muestras de suero de animales inmunizados con pT.9M+pmlFN-γ(gamma). Se fijaron en los pocillos de placas de microtitulación células tratadas o no tratadas con neuraminidasa de la línea celular de neuroblastoma humano CHP 212 rica en ácido polisialílico. Los sueros se diluyeron 1:20 y se ensayaron para determinar la unión a las placas recubiertas con células mediante ELISA. Como control negativo y positivo se utilizaron, respectivamente, anticuerpos monoclonales Seam 3 y Seam 26, a una concentración de 5 microgramos por mililitro. La unión del anticuerpo se detectó utilizando un suero anti-IgG de ratón polivalente conjugado con fosfatasa alcalina. Los datos representan las medias + las desviaciones típicas de 3 determinaciones, cada una llevada a cabo en una muestra de suero diferente.

La **Figura 6** muestra cómo los sueros de animales inmunizados con 9M protegían a los ratones recién nacidos de la letalidad inducida por MenB. La figura muestra la letalidad de las crías (<48 h de edad) provocadas s.c. con la dosis indicada de MenB cepa 2996. Cuatro horas antes de la provocación, se administraron s.c. a los ratones recién nacidos 30 µl de una dilución 1/20 de suero de un animal inmunizado con pT.9M con un título bactericida de 1:144. El preinmunosero y el AcMo Seam 3 (10 µg en PBS) hicieron de control negativo y positivo, respectivamente. Se muestra un experimento representativo utilizando muestras de suero de tres animales diferentes. Símbolo *, significativamente diferente de los ratones tratados con preinmunosero mediante la prueba de Kaplan-Meier.

La **Figura 7** muestra la reactividad del suero de conejo anti-MenB contra el mimético del péptido 9M. Se añadió un suero de conejo producido contra MenB o suero de conejo normal (ambos diluidos 1:1.000 en PBS) a los pocillos sensibilizados con el conjugado 9M-KLH (5 µg/ml) o con KLH. Se utilizó suero anti-MenB con o sin pretratamiento (1 hora a 37°C) con 1 µg/ml de MenB CP purificado. La unión del anticuerpo se detectó añadiendo cabra anti-IgG de conejo conjugado con biotina (diluido 1:10.000) seguido de estreptavidina-fosfato alcalino y p-nitrofenilfosfato.

La **Figura 8** muestra que la sensibilización-refuerzo aumenta la actividad bactericida sérica e induce una respuesta Th1. El panel de la izquierda muestra la actividad bactericida sérica en animales sensibilizados con pT.9M el día 0 y 21 y reforzados con el péptido 9M conjugado con KLH (9M-KLH) el día 42. El panel de la derecha superior e inferior muestra la distribución de isotipos de los anticuerpos anti-9M en sueros de animales

5 sometidos a sensibilización-refuerzo. Se sensibilizaron las placas con 9M-KLH (7 µg/ml) antes de añadir los sueros diluidos 1:100 en PBS complementados con KLH (10 µg/ml). Se desarrollaron las placas utilizando reactivos específicos de isotipo conjugados con fosfatasa alcalina. Las columnas blancas y grises muestran los valores de, respectivamente, los preinmunsueros e inmunsueros. Los datos representan las medias ± la DE de 4 determinaciones llevadas a cabo en muestras de suero de 56 días de los animales que presentaron respuesta representados en el panel de la izquierda.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

10	SEQ ID NO 1	PPWDFDAGEGIH (7M)
	SEQ ID NO 2	DYAWDDFYAMGD (8M)
15	SEQ ID NO 3	DYAWDQTHQ (9M)
	SEQ ID NO 4	DYAWDQTHQ (11M)
	SEQ ID NO 5	DYAWDQTHQ (12M)
20	SEQ ID NO 6	DAGDSGYLT (13M)
	SEQ ID NO 7	EFDAGDVLL (15M)
25	SEQ ID NO 8	DAGDHSHPQ (17M)
	SEQ ID NO 9	DAGEVYPPG (18M)
	SEQ ID NO 10	DAGDSAYSQ (19M)
30	SEQ ID NO 11	DAGEGGPRV (20M)
	SEQ ID NO 12	DAGEGGPRV (21M)
35	SEQ ID NO 13	DAGDHRAAA (22M)
	SEQ ID NO: 14	MRYMILGLLALAAVCSAAEF (secuencia líder)
40	SEQ ID NO 15	MRYMILGLLALAAVCSAA (secuencia líder)
	SEQ ID NO 16	MKLQYIKANSKFIGITELEF (secuencia de T cooperador)
45	SEQ ID NO 17	QYIKANSKFIGITELEF (secuencia de T cooperador)
	SEQ ID NO 18	CCGCCGTGGGACTTCGACGCGGGTGAAGGTATCCAC (7M)
50	SEQ ID NO 19	CCACCTTGGGATTCGATGCCGCGAGGGCATTAC (7Mp)
	SEQ ID NO 20	GACTACGCGTGGGACGACTTCTACGCGATGGGGAT (8M)
55	SEQ ID NO 21	GATTATGCATGGGATGACTTCTACGCTATGGGTGAC (8Mp)
	SEQ ID NO 22	GATTACGCATGGGACCAAACCCATTAG (9M)
	SEQ ID NO 23	GATTATGCCTGGGATCAGACTCACCAG (9Mp)
60	SEQ ID NO 24	GATGCTGGCGACTCTGGCTATTTGACG (13M)
	SEQ ID NO 25	GATGCCGCGATTCTGGCTATCTGACT (13Mp)
65	SEQ ID NO 26	GAGTTCGATGCCGGTGACGTGTTGCTG (15M)
	SEQ ID NO 27	GACGCTGGGGACCATTGCGATCCGCAG

(17M)
 SEQ ID NO 28 GATGCCGGCGATCACTCTCACCCACAG
 (17Mp)
 5 SEQ ID NO 29 GATGCTGGGGAAGTATATCCAGGTCCG
 (18M)
 SEQ ID NO 30 GACGCCGGCGATTGGGCGTACTCCCAG
 (19M)
 SEQ ID NO 31 GATGCGGGCGAGGGCGGGCCACGCGTG
 (20M)
 10 SEQ ID NO 32 GACGCAGGCGATCATCGCGGGCGGCG
 (22M)
 SEQ ID NO 33 DYAWDQTHQDPAK
 (pS.9M)
 15 SEQ ID NO 34 PPWDFDAGEGIHGDP
 (pS.7M)
 SEQ ID NO: 35 ATGAGGTACATGATTTTAGGCTTGCTCGCCCTTGCGGCAGTCTGCAGCGCTGCCGAATTC
 (secuencia
 líder)
 20 SEQ ID NO 36 ATGAGGTACATGATTTTAGGCTTGCTCGCCCTTGCGGCAGTCTGCAGCGCTGCC
 (secuencia
 líder)
 SEQ ID NO 37 ATGAAACTACAGTATATAAAAAGCAAATTCTAAATTTATAGGTATAACTGAACTAGAATTC
 (secuencia de
 T cooperador)
 25 SEQ ID NO 38 CAGTATATAAAAAGCAAATTCTAAATTTATAGGTATAACTGAACTAGAATTC
 (secuencia de
 T cooperador)

30 En las que 7MP, 8MP, 9MP, 13MP y 17MP representan las secuencias plasmídicas relacionadas con las correspondientes secuencias de clones, que se optimizaron para las preferencias de codón murino.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

35 **Selección de péptidos**

Para obtener péptidos que imitan un epítipo protector sin reactividad cruzada en seres humanos del polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* grupo B (MenB CP), se utilizó como molde un anticuerpo monoclonal (AcMo), Seam 3, que reconoce un epítipo de ese tipo. Se utilizaron de forma independiente dos bibliotecas de péptidos de presentación en fagos combinatorias, basadas respectivamente en nonapéptidos y dodecapéptidos fusionados a una proteína principal de la cubierta (pVIII) del fago M13. Después de tres rondas de selección utilizando Seam 3 como cebo, se obtuvieron 13 clones de fagos, dos de la biblioteca de dodecapéptidos y once de la biblioteca de nonapéptidos, que reaccionaron fuertemente contra Seam 3 (Figura 1), pero no contra un AcMo irrelevante emparejado por isotipo (no mostrado). Por otra parte, la unión de todos los clones fue inhibida por MenB CP purificado (Figura 1). Estos datos sugieren que los péptidos imitan un epítipo capsular reconocido por el AcMo Seam 3.

50 Se secuenciaron los fragmentos amplificados por PCR que contenían los insertos de fago (Tabla 1). De los 13 clones de fagos obtenidos, se descubrió que dos (20M y 21M) expresaban la secuencia DAGEGGPRV, tres (9M, 11M y 12M) la secuencia DYAWDQTHQD, mientras que los demás expresaban diferentes secuencias con el motivo consenso DAGE/D. La secuencia consenso menos representada DYAWD fue perceptible por la presencia de triptófano (W), que es relativamente raro en los insertos de la biblioteca. Se seleccionaron dos clones, 7M y 9M, representativos de las dos secuencias consenso para estudios posteriores.

55

60

65

TABLA 1:

NOMBRE DEL CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS															
7M (SEQ ID No 1)	P	P	W	D	F	D	A	G	E	G	I	H	-	-	-	-
8M (SEQ ID No 2)	-	-	-	-	D	Y	A	W	D	D	F	Y	A	M	G	D
9M (SEQ ID No 3)	-	-	-	-	D	Y	A	W	D	Q	T	H	Q	-	-	-
11M (SEQ ID No 4)	-	-	-	-	D	Y	A	W	D	Q	T	H	Q	-	-	-
12M (SEQ ID No 5)	-	-	-	-	D	Y	A	W	D	Q	T	H	Q	-	-	-
13M (SEQ ID No 6)	-	-	-	-	-	D	A	G	D	S	G	Y	L	T	-	-
15M (SEQ ID No 7)	-	-	-	E	F	D	A	G	D	V	L	L	-	-	-	-
17M (SEQ ID No 8)	-	-	-	-	-	D	A	G	D	H	S	H	P	Q	-	-
18M (SEQ ID No 9)	-	-	-	-	-	D	A	G	E	V	Y	P	G	P	-	-
19M (SEQ ID No 10)	-	-	-	-	-	D	A	G	D	S	A	Y	S	Q	-	-
20M (SEQ ID No 11)	-	-	-	-	-	D	A	G	E	G	G	P	R	V	-	-
21M (SEQ ID No 12)	-	-	-	-	-	D	A	G	E	G	G	P	R	V	-	-
22M (SEQ ID No 13)	-	-	-	-	-	D	A	G	D	H	R	A	A	A	-	-

Construcción de plásmidos de ADN y análisis de la expresión

Se clonaron oligodesoxinucleótidos que codificaban los péptidos 7M y 9M en un vector de mamífero adecuada para la vacunación con ADN para producir p9M y p7m. Se incluyeron una secuencia líder de secreción de adenovirus E3 o una secuencia de T cooperador de toxoide tetánico, o ambas, en algunos constructos de ADN para aumentar la expresión exógena y proporcionar ayuda de linfocitos T, respectivamente. Los plásmidos resultantes se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Descripción	Secuencia Líder	Secuencia de T cooperador	Secuencia Antigénica
pCI-neo	-	-	-
pS.9M	<u>MRYMILGLLALAAVCSAAEF</u> (SEQ ID No 14)	-	DYAWDQTHQDPAK (SEQ ID No 33)
pT.9M	-	<u>MKLQYIKANSKFIGITELEF</u> (SEQ ID No 16)	DYAWDQTHQDPAK (SEQ ID No 33)
pST.9M	<u>MRYMILGLLALAAVCSAA</u> (SEQ ID No 15)	<u>QYIKANSKFIGITELFF</u> (SEQ ID No 17)	DYAWDQTHQDPAK (SEQ ID No 33)
p9M	-	-	DYAWDQTHQDPAK (SEQ ID No 33)
pS.7M	<u>MRYMILGLLALAAVCSAAEF</u> (SEQ ID No 14)	-DYAWDQTHQDPAK	DYAWDQTHQDPAK (SEQ ID No 33)
pT.7M	-	<u>KLQYIKANSKFIGITELEF</u> (SEQ ID No 16)	PPWDFDAGEGIHGDKPAK (SEQ ID No 34)
pST.7M	<u>MRYMILGLLALAAVCSAA</u> (SEQ ID No 15)	<u>QYIKANSKFIGITELEF</u> (SEQ ID No 17)	PPWDFDAGEGIHGDKPAK (SEQ ID No 34)
p7M	-	-	PPWDFDAGEGIHGDKPAK (SEQ ID No 34)
pmIL12	-	-	-
PmIFN	-	-	-

Se utilizaron los plásmidos p9M y p7m para transfectar de manera transitoria células COS-7. Se analizó la expresión de proteínas por la capacidad de las células permeabilizadas de unirse al AcMO Seam 3 utilizando inmunofluorescencia. Las células transfectadas con plásmidos presentaron un aumento de la fluorescencia con respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío (pCI-Neo) después del tratamiento con el AcMo Seam 3 seguido de anti-IgG de ratón conjugado con FICT (Figura 2). Estos datos indican que la transfección con cualquiera de p7m o p9M da como resultado la expresión de péptidos en forma funcional, tal como se definen por su capacidad para unirse al idiotipo de Seam 3. Se obtuvieron datos similares utilizando los demás plásmidos enumerados en la Tabla 2.

Actividad bactericida después de la inmunización con ADN

Se recogieron los sueros de ratones inmunizados i.m. tres veces, a intervalos de 21 días, con los diferentes plásmidos (150 µg en 50 µl de PBS), 56 días después de la primera inmunización y se ensayaron para determinar su capacidad para inducir actividad bactericida dependiente del complemento. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos después de la inmunización con plásmidos que contenían el gen 7M. La actividad bactericida sérica se encontraba por debajo de los límites de detección del ensayo en animales a los que se administró el vector vacío

(pCI-Neo, Figura 3) o en muestras de preinmunosero (datos no mostrados). No hubo actividad bactericida detectable en los sueros de animales inmunizados con los dos plásmidos que contenían un péptido señal de secreción antes de la secuencia 7M (pS.7M y pST.7M, respectivamente, con o sin el epítipo de T cooperador). Sin embargo, 2 y 3 de 8 animales inmunizados con los respectivos plásmidos desprovistos del péptido señal (p7m y pT.7M) tenían una actividad bactericida sérica moderada. La co-administración de pT.7M con plásmidos que contenían el gen de IL-12 o de IFN- γ aumentó adicionalmente el número de animales que presentaron respuesta. Por el contrario, la actividad bactericida se encontraba por debajo del límite de detección del ensayo en animales a los que se administró pmlIL12 o pmlIFN- γ en solitario. Estos datos indicaban que la inmunización con el minigen de 7M fusionado a una secuencia del epítipo de linfocito T producía aumentos significativos en la actividad bactericida sérica cuando se co-administraba con vectores que expresaban IL-12 o IFN- γ .

La Figura 4 muestra que se obtuvieron datos similares después de la inmunización con plásmidos que contenían el minigen de 9M. Los resultados se compararon con los obtenidos después de la inmunización en adyuvante de Freund con el péptido 9M conjugado con KLH. Tal inmunización indujo actividad bactericida en la mitad de los animales. De forma similar, 3 de cada 8 animales inmunizados con p9M mostraron actividad bactericida sérica detectable. La presencia de un epítipo de T cooperador en pT.9M tendía a mejorar adicionalmente la media de los títulos y el porcentaje de animales que presentaron respuesta. La co-administración de pT9M con plásmidos que contenían el gen de IL-12 o de IFN- γ aumentaba el número de animales que presentaban respuesta a 6/10 y 7/10, respectivamente. En general, la media de los títulos bactericidas tendían a ser mayores en los animales inmunizados con 9M con respecto a los inmunizados con 7M (compárense las Figuras 3 y 4). Una vez más, no se detectó elevación de la actividad bactericida sérica en los animales inmunizados con vectores que contenían una secuencia señal de secreción (es decir, pS.9M y pST.9M, Figura 4).

A continuación, se trató de confirmar que la respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización con los constructos descritos anteriormente se dirigía contra su diana prevista por ejemplo, el MenB CP. Esto se consideró importante ya que la administración con citocinas puede producir la activación policlonal. En un experimento representativo de la actividad bactericida inducida por pT.9M-pmIFN- γ la co-inmunización fue totalmente inhibida por MenB CP purificado o por el conjugado 9M-KLH, pero no por KLH en solitario (panel de la izquierda de la Figura 5). Se obtuvieron datos similares con otras muestras de suero seleccionadas al azar del experimento que se muestra en la Figura 4 (no mostrado). Por otra parte, se observó actividad bactericida utilizando dos cepas de MenB adicionales, pero no una cepa mutante encapsulada (panel de la derecha de la Figura 5). Juntos, estos datos indican que la inmunización con pT.9M puede inducir anticuerpos bactericidas específicos para el péptido 9M que presentan reaccionan cruzada con el MenB CP.

Inmunoprotección pasiva

Para evaluar plenamente las propiedades funcionales de las respuestas de anticuerpos inducidas por la inmunización con pT.9M, se estudió la capacidad de los inmunoseros para proteger pasivamente a ratones recién nacidos contra la infección meningocócica. En los experimentos mostrados en la Figura 6, se observó la letalidad de las crías a las que se inocularon 30 μ l de una dilución 1/20 de un suero (con un título de 144) obtenido después de la inmunización con pT.9M, después de la provocación con MenB. El preinmunosero y el AcMo Seam 3 se incluyeron como control positivo y negativo, respectivamente. La Figura 6 muestra que los ratones tratados con el inmunosero quedaron significativamente protegidos contra diferentes dosis bacterianas. Estos datos indican que la inmunización con pT.9M induce anticuerpos séricos con actividad protectora notable.

Otras especies

En experimentos adicionales, se investigó si los anticuerpos anti-MenB CP de especies distintas del ratón podían reconocer el mimético de 9M. Se determinó mediante ELISA la distribución de isotipo de los anticuerpos anti-9M, utilizando 9M-KLH (7 μ g/ml) como antígeno de recubrimiento. Las muestras de suero se diluyeron 1:100 en PBS complementado con 10 μ g/ml de KLH antes de la adición a los pocillos. Los anticuerpos anti-PSA humana se detectaron utilizando células de neuroblastoma CHP 212 tratadas o no tratadas con neuraminidasa, que expresaban altos niveles de PSA. Los títulos de anticuerpos anti-MenB CP se determinaron mediante ELISA. La Figura 7 muestra que los anticuerpos anti-MenB CP de especies distintas del ratón podrían de hecho reconocer el mimético de 9M. En el ensayo de ELISA, un suero policlonal de conejo anti-MenB, pero no el suero normal, reaccionó contra el conjugado 9M-KLH. Por otra parte, en este ensayo, la unión fue inhibida por la adición de MenB CP purificado (Figura 7). Estos datos indican que el mimotopo del péptido 9M interactúa específicamente no sólo con el AcMo utilizado para su selección, sino también con anticuerpos policlonales de conejo específicos contra MenB CP.

Efectos de la sensibilización con ADN seguida de refuerzo con péptido

Dado que los resultados experimentales indican que la inmunización con el conjugado péptido9M-KLH o pT.9M podría inducir una actividad bactericida sérica significativa, a continuación se ensayó si los títulos bactericidas podrían aumentarse adicionalmente mediante la sensibilización con pT.9M seguida de refuerzo con 9M-KLH. Se observó la actividad bactericida en la mitad de los animales después de dos administraciones de pT.9M (Figura 8a). En estos respondedores (muestras de suero 1-4), pero no en los no respondedores (muestras de suero 5-8), el

refuerzo con 9M-KLH indujo aumentos de cuatro a ocho veces en la actividad bactericida sérica. Estos datos indican que la sensibilización con ADN seguida de refuerzo con péptido efectivamente aumenta los títulos bactericidas.

5 **Especificidad de isotipo de las respuestas inducidas por 9M**

Se analizaron los anticuerpos inducidos en los animales sensibilizados con pT.9M y reforzados con 9M-KLH para determinar su distribución por clase/subclase. Después de recubrir las placas con KLH-9M o con KLH en solitario, se puso de manifiesto la presencia de anticuerpos unidos con los reactivos específicos de isotipo. Se observó una respuesta débil en las placas recubiertas con KLH en solitario, que podía inhibirse totalmente añadiendo KLH en la mezcla de reacción (10 µg/ml; datos no mostrados). La figura 8b muestra la reactividad de los sueros (diluidos 1:100 en tampón que contenía 10 µg/ml de KLH) a partir de animales sensibilizados con pT.9M seguido de inmunización con 9M-KLH. Los anticuerpos anti-9M fueron principalmente de la clase IgG, con un predominio de IgG2a (Figuras 8b y 8c). Por el contrario, los sueros de los animales sometidos a la vacunación génica en solitario (es decir, que recibieron p.T9M tres veces y sin refuerzo con KLH-9M) presentaron una prevalencia de IgM o una respuesta de IgG mixta (datos no mostrados). Estos datos demuestran que la sensibilización con ADN seguida de refuerzo con péptido daba como resultado una respuesta de anticuerpos de tipo Th1.

20 **Inmunoprotección pasiva**

A fin de evaluar adicionalmente las propiedades funcionales de las respuestas de anticuerpos inducidas por la inmunización con pT.9M, los inventores determinaron la capacidad de los inmunosueros para proteger pasivamente a las crías de rata de la bacteriemia meningocócica. En resumen, se inocularon por vía intraperitoneal ratas Wistar de siete días de edad (Charles River) con sueros de ratón sometidos a dilución en serie y, 2 horas después, se provocaron por vía intraperitoneal con 2×10^3 UFC de MenB (cepa 2996). Las muestras de sangre se obtuvieron 18 horas después de la provocación y se consideró la dilución sembrada más baja (1:10; 100 UFC/ml) el límite de detección del ensayo. Las crías se consideraron protegidas de la bacteriemia en presencia de un cultivo de sangre estéril. En los experimentos que se muestran en la Tabla 3, las crías a las que se inoculó una dilución de hasta 1:4 de una combinación de sueros obtenida de animales sensibilizados con ADN y reforzados con péptido quedaron efectivamente protegidas frente a la bacteriemia. Estos datos indican que la inmunización con pT.9M induce anticuerpos séricos que tienen una actividad protectora en un modelo animal bien caracterizado de infección por MenB.

35 **TABLA 3:**

Muestra	UFC/ml (media geométrica) ^a	Número de ratas protegidas/total
AcMo Seam 3, control positivo (2 µg)	<100	4/4
PBS	46.062	0/5
Combinación de pre-inmunosueros diluida ½	4.124	0/8
pCI (vector vacío)	2.574	0/8
Combinación de inmunosueros diluida ½		
pT.9M + 9M-KLH	104	6/8
Combinación de inmunosueros diluida ¼		
Combinación de inmunosueros diluida ¼	136	6/8
Combinación de inmunosueros diluida ⅙	2.352	1/8

^a Para la determinación de las medias geométricas, se asignó a los animales que dieron negativo en el cultivo un valor arbitrario de 50 UFC/ml (es decir, la mitad de 100 UFC/ml, el límite inferior de detección).

50 **REFERENCIAS**

- 55 [1] Poolman *et al.* (1995) Surface structures and secreted products of meningococci. In K. Cartwright (ed.) Meningococcal disease. John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. pág. 21-34
- [2] Rosenstien *et al.* (2001) Meningococcal disease. N. Engl. J. Med. 344:1378-1388.
- [3] Jennings, H.J. y Lugowski. C. (1981). Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates. J. Immunol. 127:1011-1018.
- 60 [4] Finne *et al.* (1983). Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. Lancet. 2:355-357.
- [5] Granoff *et al.* (1998). Bactericidal monoclonal antibodies that define unique meningococcal B polysaccharide epitopes that do not cross-react with human polysialic acid. J Immunol. 160:5028-5036.
- [6] Shin *et al.* (2001). Monoclonal antibodies specific for Neisseria meningitidis group B polysaccharide and their peptide mimotopes. Infect. Immun. 69:3335-3342.
- 65 [7] Bodanszky (1993) Principles of Peptide Synthesis (ISBN: 0387564314).
- [8] Fields *et al.* (1997) Meth Enzymol 289: Solid-Phase Peptide Synthesis. ISBN: 0121821900.

- [9] Chan y White (2000) Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. ISBN: 0199637245.
 [10] Kullmann (1987) Enzymatic Peptide Synthesis. ISBN: 0849368413.
 [11] Ibba (1996) Biotechnol Genet Eng Rev 13:197-216.
 [12] Kazmierski (1999) Peptidomimetics Protocols. ISBN: 0896035174.
 5 [13] Abell (1999) Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics. ISBN: 0762306149.
 [14] Patente de EE.UU. 5.331.573 (Balaji).
 [15] Goodman *et al.* (2001) Biopolymers 60:229-245.
 [16] Hruby y Balse (2000) Curr Med Chem 7:945-970.
 [17] Ribka y Rich (1998) Curr Opin Chem Biol 2:441-452.
 10 [18] Chakraborty *et al.* (2002) Curr Med Chem 9:421-435.
 [19] Computer-Assisted Lead Finding and Optimization (eds. Testra & Folkers, 1997).
 [20] Disponible en Molecular Simulations Inc (<http://www.msi.com/>).
 [21] Davic y Lawrence (1992) Proteins 12:31-41.
 [22] Cafilish *et al.* (1993) J. Med. Chem. 36:2142-67
 15 [23] Eisen *et al.* (1994) Proteins: Str. Funct. Genet. 19:199-221.
 [24] Böhm (1992) J. Comp. Aided Molec. Design 6:61-78.
 [25] Gehlhaar *et al.* (1995) J. Med. Chem. 38:466-72.
 [26] Moon y Howe (1991) Proteins: Str. Funct. Genet. 11:314-328.
 [27] Disponible en <http://chem.leeds.ac.uk/ICAMS/SPROUT.html>.
 20 [28] Lauri y Bartlett (1994) Comp. Aided Mol. Design 8:51-66.
 [29] Disponible en Tripos Inc (<http://www.tripos.com>).
 [30] Rotstein *et al.* (1993) J. Med. Chem. 36:1700.
 [31] Lai (1996) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 36:1187-1194.
 25 [32] Donnelly *et al.* (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648.
 [33] Strugnell *et al.* (1997) Immunol Cell Biol 75(4):364-369.
 [34] Cui (2005) Adv Genet 54:257-89.
 [35] Robinson y Torres (1997) Seminars in Immunol 9:271-283.
 [36] Brunham *et al.* (2000) J Infect Dis 181 Supl 3:5538-43.
 [37] Svanholm *et al.* (2000) Scand J Immunol 51(4):345-53.
 30 [38] DNA Vaccination - Genetic Vaccination (1998) eds. Koprowski *et al.* (ISBN 3540633928).
 [39] Gene Vaccination: Theory and Practice (1998) ed. Raz (ISBN 3540644288).
 40 Prinz, D.M. *et al.*, Immunology (2003) 110:242-249
 [41] Findeis *et al.*, Trends Biotechnol. (1993) 11:202.
 [42] Chiou *et al.* (1994) Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer. ed. Wolff.
 35 [43] Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1988) 263:621.
 [44] Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1994) 269:542.
 [45] Zenke *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87:3655.
 [46] Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1991) 266:338.
 [47] Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51.
 40 [48] Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845.
 [49] Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185.
 [50] Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148.
 [51] WO 90/07936.
 [52] WO 94/03622.
 45 [53] WO 93/25698.
 [54] WO 93/25234.
 [55] US 5.219.740.
 [56] WO 93/11230.
 [57] WO 93/10218.
 50 [58] US 4.777.127.
 [59] GB 2.200.651.
 [60] EP-A-0 345 242.
 [61] WO 91/02805.
 [62] WO 94/12649.
 55 [63] WO 93/03769.
 [64] WO 93/19191.
 [65] WO 94/28938.
 [66] WO 95/11984.
 [67] WO 95/00655.
 60 [68] Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.
 [69] Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985.
 [70] US 5.814.482.
 [71] WO 95/07994.
 [72] WO 96/17072.
 65 [73] WO 95/30763.
 [74] WO 97/42338.

- [75] WO 90/11092.
 [76] US 5.580.859.
 [77] US 5.422.120.
 5 [78] WO 95/13796.
 [79] WO 94/23697.
 [80] WO 91/14445.
 [81] EP 0524968.
 [82] Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:2411.
 10 [83] Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:11581.
 [84] US 5.206.152.
 [85] WO 92/11033.
 [86] US 5.149.655.
 [87] WO 92/11033.
 15 [88] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [89] Vaccine Design. (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 [90] WO00/23105.
 [91] WO90/14837.
 [92] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-80.
 20 [93] Frey *et al.* (2003) *Vaccine* 21:4234-7.
 [94] Patente de EE.UU. 6.299.884.
 [95] Patente de EE.UU. 6.451.325.
 [96] Patente de EE.UU. 5.057.540.
 [97] WO96/33739.
 25 [98] EP-A-0109942.
 [99] WO96/11711.
 [100] WO00/07621.
 [101] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 [102] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
 30 [103] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
 [104] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
 [105] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
 [106] Gerber *et al.* (2001) *Virology* 75:4752-4760.
 [107] WO03/024480
 [108] WO03/024481
 35 [109] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
 [110] EP-A-0689454.
 [111] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 [112] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 40 [113] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
 [114] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 [115] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 [116] WO02/26757.
 [117] WO99/62923.
 45 [118] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 [119] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
 [120] WO98/40100.
 [121] Patente de EE.UU. 6.207.646.
 [122] Patente de EE.UU. 6.239.116.
 [123] Patente de EE.UU. 6.429.199.
 50 [124] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658.
 [125] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
 [126] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
 [127] WO01/95935.
 [128] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
 55 [129] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
 [130] WO03/035836.
 [131] WO95/17211.
 [132] WO98/42375.
 60 [133] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
 [134] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
 [135] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
 [136] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
 [137] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
 [138] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
 65 [139] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
 [140] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.

- [141] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
 [142] WO99/40936.
 [143] WO99/44636.
 [144] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
 5 [145] WO99/27960.
 [146] Patente de EE.UU. 6.090.406
 [147] Patente de EE.UU. 5.916.588
 [148] EP-A-0626169.
 [149] WO99/52549.
 10 [150] WO01/21207.
 [151] WO01/21152.
 [152] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 [153] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
 [154] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
 15 [155] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
 [156] WO04/60308
 [157] WO04/64759.
 [158] WO99/11241.
 [159] WO94/00153.
 20 [160] WO98/57659.
 [161] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
 [162] WO03/009869.
 [163] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698.
 [164] Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
 25 [165] Solicitud de patente internacional WO03/007985.
 [166] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 [167] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
 [168] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
 [169] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
 30 [170] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
 [171] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Supl: S63-68 y 79-80.
 [172] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 [173] Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
 [174] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 35 [175] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 [176] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 [177] Zimmerman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
 [178] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S141-107.
 [179] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
 40 [180] Solicitud de patente internacional WO02/34771.
 [181] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 [182] Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 [183] Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
 [184] EP-A-0372501
 45 [185] EP-A-0378881
 [186] EP-A-0427347
 [187] WO93/17712
 [188] WO94/03208
 [189] WO98/58668
 50 [190] EP-A-0471177
 [191] EP-A-0594610.
 [192] WO00/56360
 [193] WO91/01146
 [194] WO00/61761
 55 [195] WO01/72337
 [196] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
 [197] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun.* 72:4884-7
 [198] WO02/091998.
 [199] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
 60 [200] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
 [201] Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
 [202] Rice *et al.* (2000) *Trends Genet* 16:276-277.
 [203] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [204] *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
 65 [205] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications)

- [206] Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989).
 [207] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [208] Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed. (Ausubel *et al.* eds., 1999, John Wiley & Sons)
 [209] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press)
 [210] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
- <110> Giuseppe Teti
 <110> Franco Felici
 <120> Péptidos que imitan epítopos protectores sin reactividad cruzada en seres humanos del polisacárido capsular de meningococo del grupo B
 <130> P043858WO
 <150> 0611914.3
 <151> 15-06-2006
 <160> 38
 <170> SeqWin99, versión 1.02
 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido
 <400> 1
- Pro Pro Trp Asp Phe Asp Ala Gly Glu Gly Ile His
 1 5 10
- <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido
 <400> 2
- Asp Tyr Ala Trp Asp Asp Phe Tyr Ala Met Gly Asp
 1 5 10
- <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido
 <400> 3
- Asp Tyr Ala Trp Asp Gln Thr His Gln
 1 5

ES 2 478 010 T3

5
<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido

10
<400> 4

Asp Tyr Ala Trp Asp Gln Thr His Gln
1 5

15
<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido

25
<400> 5

30
Asp Tyr Ala Trp Asp Gln Thr His Gln
1 5

35
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40
<220>
<223> péptido

<400> 6

45
Asp Ala Gly Asp Ser Gly Tyr Leu Thr
1 5

50
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55
<220>
<223> péptido

60
<400> 7

65
Glu Phe Asp Ala Gly Asp Val Leu Leu
1 5

ES 2 478 010 T3

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> péptido
10
<400> 8
Asp Ala Gly Asp His Ser His Pro Gln
1 5
15
Asp Ala Gly Asp His Arg Ala Ala Ala
1 5
20
<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> secuencia líder del adenovirus E3
25
<400> 14
30
Met Arg Tyr Met Ile Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala Ala Val Cys Ser
1 5 10 15
35
Ala Ala Glu Phe
20
40
<210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> secuencia líder del adenovirus E3
45
<400> 15
50
Met Arg Tyr Met Ile Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala Ala Val Cys Ser
1 5 10 15
Ala Ala
55
<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia de T cooperador del toxoide tetánico
60
<400> 16
65

ES 2 478 010 T3

5 Met Lys Leu Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr
1 5 10 15
Glu Leu Glu Phe
20

10 <210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia de T cooperador del toxoide tetánico

15 <400> 17

20 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Glu
1 5 10 15
Phe

25 <210> 18
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido

35 <400> 18
ccgccgtggg acttcgacgc gggggaaggt atccac 36

40 <210> 19
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido

50 <400> 19
ccacctggg atttcgatgc cggcgagggc atccac 36

55 <210> 20
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> oligonucleótido

65 <400> 20
gactacgcgt gggacgactt ctacgcgatg ggggat 36

60 <210> 21
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 21
 gattatgcat gggatgactt ctacgctatg ggtgac 36

5
 <210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 22
 gattacgcat gggaccaaac ccattag 27

15
 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 23
 gattatgcct gggatcagac tcaccag 27

25
 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 24
 gatgctggcg actctggcta ttgacg 27

35
 <210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 25
 gatgccggcg attctggcta tctgact 27

45
 <210> 26
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 26
 gagttc gatg cgggtgacgt gttgctg 27

55
 <210> 27
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60
 <220>
 <223> oligonucleótido

65
 <220>
 <223> oligonucleótido

ES 2 478 010 T3

<400> 27
gacgctgggg accattcgca tccgcag 27

5 <210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 28

15 gatgccggcg atcaactctca cccacag 27

20 cagtatataa aagcaaattc taaatttata ggtataactg aactagaatt c 51

25 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> péptido

<400> 9

35 Asp Ala Gly Glu Val Tyr Pro Gly Pro
1 5

40 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 10

50 Asp Ala Gly Asp Ser Ala Tyr Ser Gln
1 5

55 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> péptido

<400> 11

65

ES 2 478 010 T3

5 Asp Ala Gly Glu Gly Gly Pro Arg Val
1 5

10 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> péptido
<400> 12

20 Asp Ala Gly Glu Gly Gly Pro Arg Val
1 5

25 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> péptido
<400> 13

35 <210> 29
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> oligonucleótido
<400> 29
gatgctgggg aagtatatcc aggtccg 27

45 <210> 30
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> oligonucleótido
<400> 30
gacgccggcg attcggcgta ctcccag 27

55 <210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> oligonucleótido

65 <400> 31
gatgcgggcg agggcgggcc acgcgtg 27

ES 2 478 010 T3

5 <210> 32
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 10 <400> 32
 gacgcaggcg atcatcgcg ggcggcg 27

 15 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido

 20 <400> 33

 25 Asp Tyr Ala Trp Asp Gln Thr His Gln Asp Pro Ala Lys
 1 5 10

 30 <210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido

 35 <400> 34

 40 Pro Pro Trp Asp Phe Asp Ala Gly Glu Gly Ile His Gly Asp Pro Ala
 1 5 10 15
 Lys

 45 <210> 35
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 35
 55 atgaggtagc tgatttagg ctgctcgcc ctgcggcag tctgcagcgc tgccgaattc 60

 60 <210> 36
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 65 <400> 36
 atgaggtagc tgatttagg ctgctcgcc ctgcggcag tctgcagcgc tgcc 54

ES 2 478 010 T3

5 <210> 37
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

10 <400> 37
atgaaactac agtatataaa agcaaattct aaatttatag gtataactga actagaattc 60

15 <210> 38
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 38

25

30

35

40

45

50

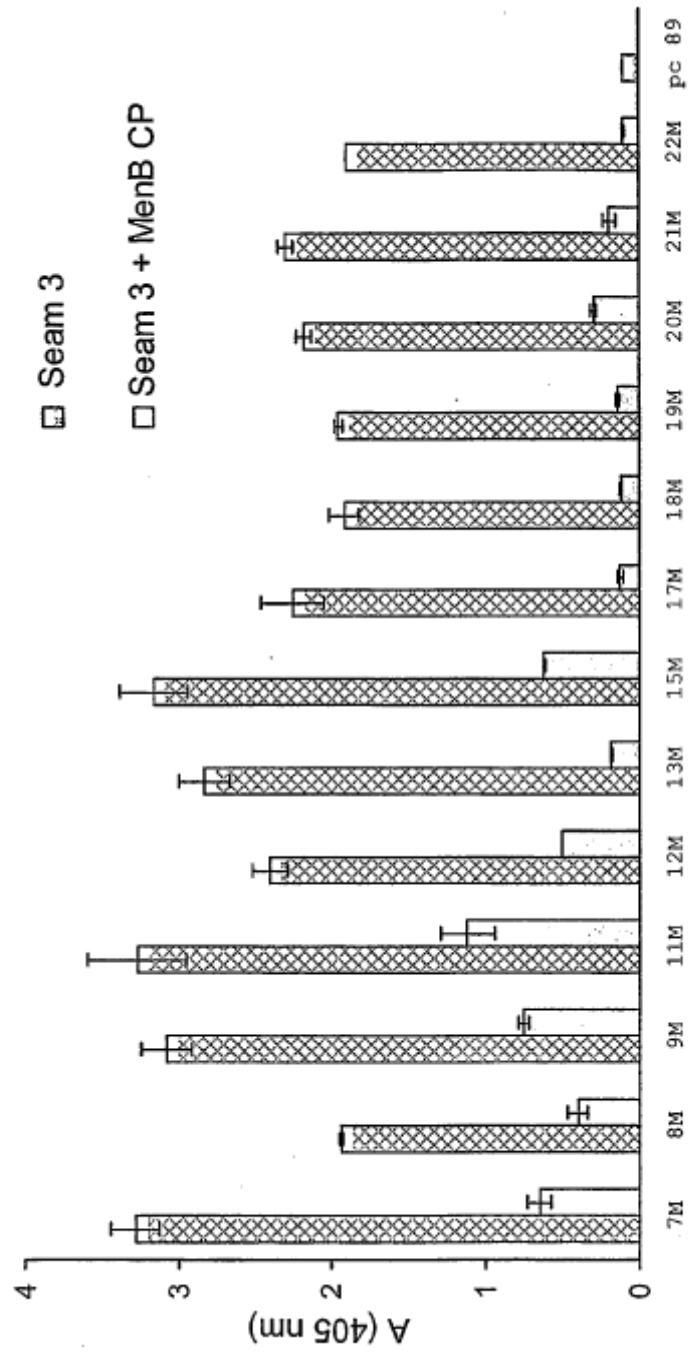
55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mimético molecular de un epítipo único de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (MenB), en el que dicho mimético consiste en un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 1 ó 3.
2. Ácido nucleico que codifica un polipéptido según la reivindicación 1.
3. Ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 18, 19, 22 ó 23.
- 10 4. Composición de vacuna que comprende una molécula peptídica o de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. Composición de vacuna según la reivindicación 4, en la que la molécula peptídica tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 ó 3.
6. Composición de vacuna según la reivindicación 4 en la que dicha molécula peptídica está unida covalentemente a una molécula transportadora.
- 20 7. Composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 4-6 que comprende adicionalmente un adyuvante.
8. Composición de vacuna según la reivindicación 4, en la que la molécula de ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 18, 19, 22 ó 23.
- 25 9. Composición farmacéutica que comprende el polipéptido según la reivindicación 1 o el ácido nucleico según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. Polipéptido según la reivindicación 1 o ácido nucleico según la reivindicación 2 o la reivindicación 3 para uso en medicina.
11. Uso del polipéptido según la reivindicación 1 o el ácido nucleico según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la fabricación de un medicamento para proteger a un paciente de la infección por MenB.
- 35 12. Uso según la reivindicación 11 en el que el ácido nucleico según la reivindicación 2 o la reivindicación 3 se utiliza como sensibilizador y el polipéptido según la reivindicación 1 se utiliza como refuerzo.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



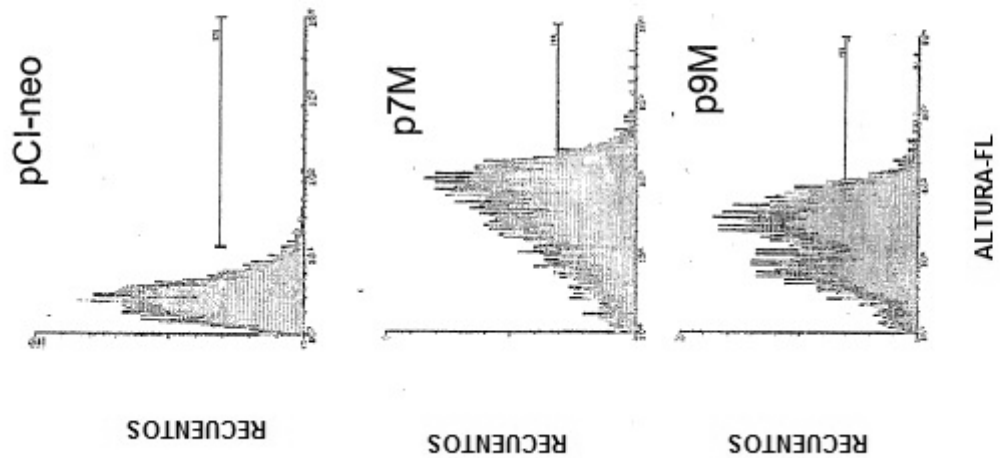


Fig. 2

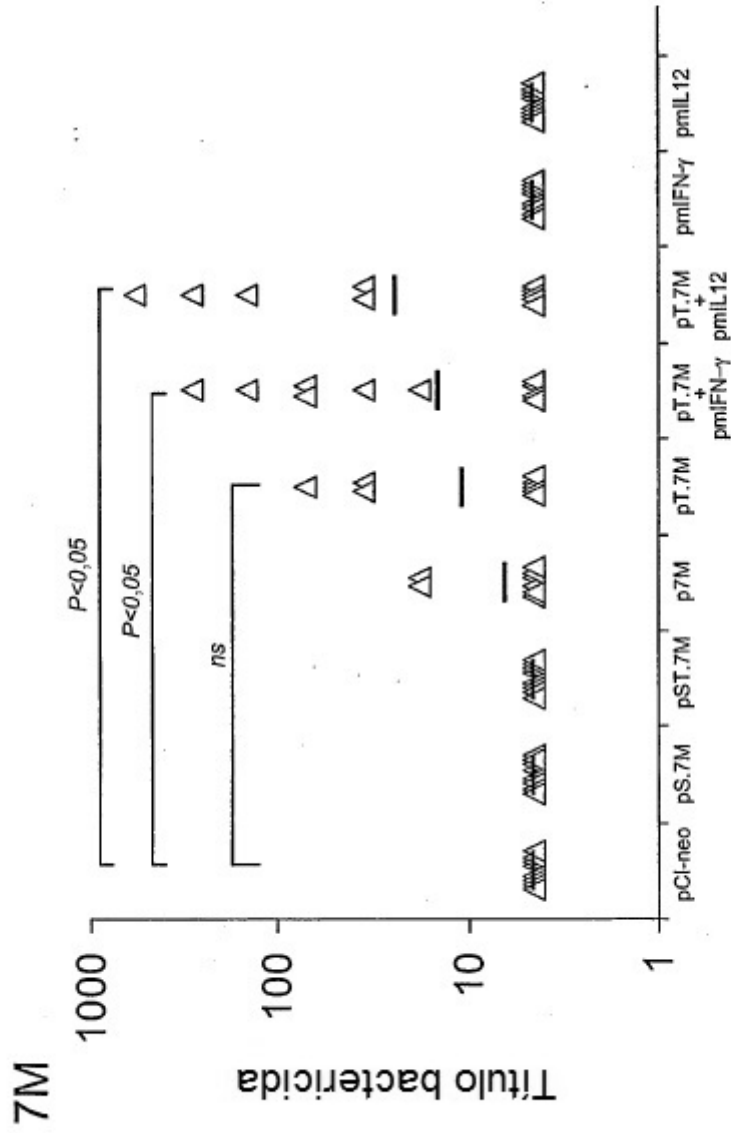


Fig. 3

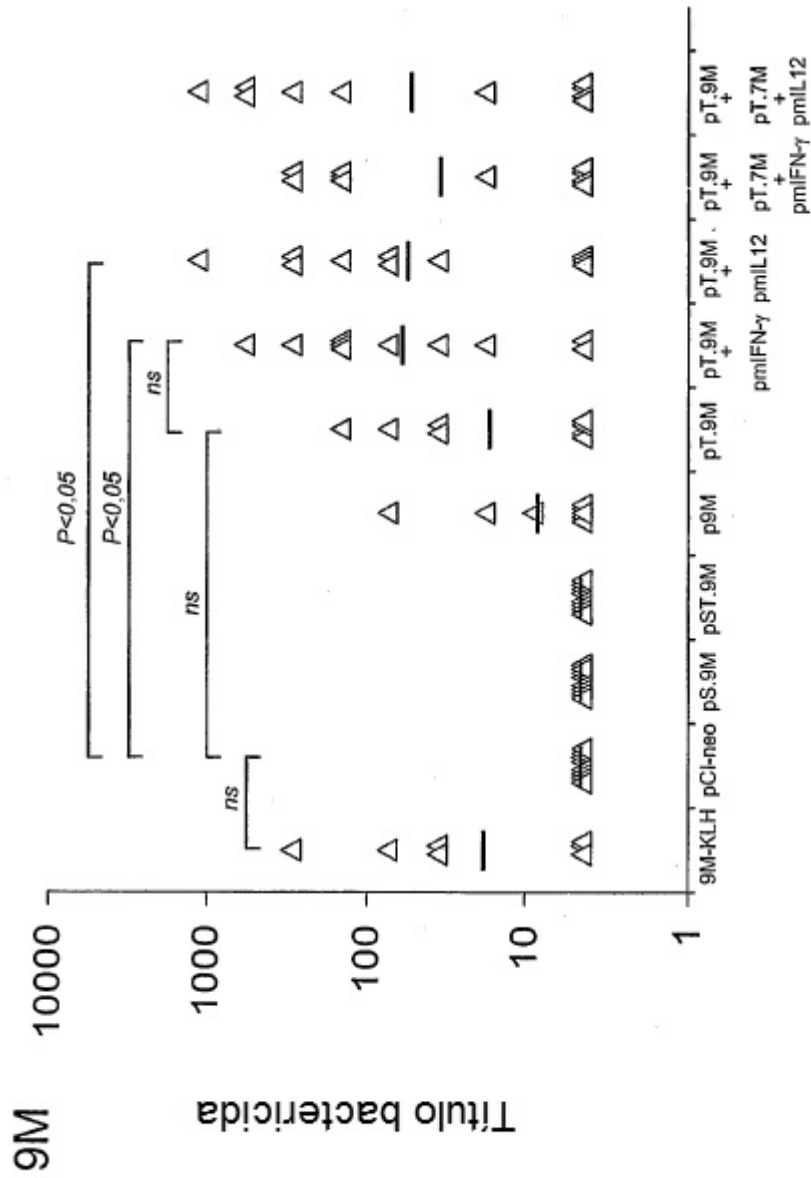


Fig. 4

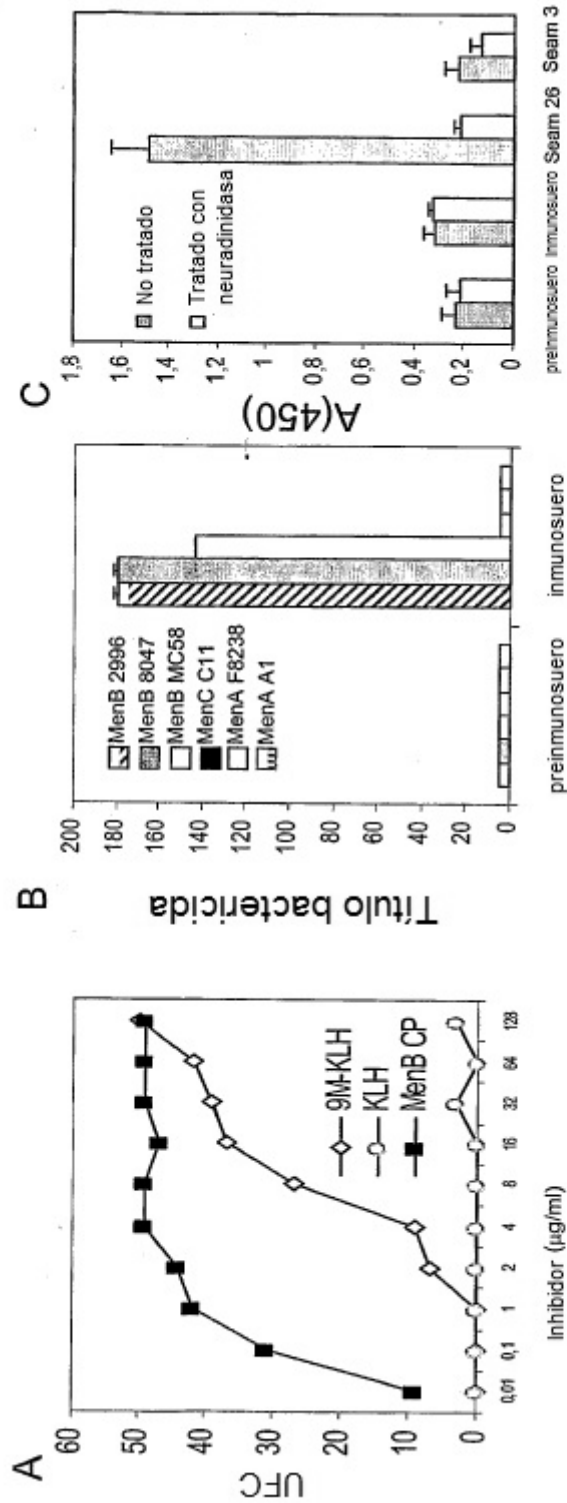


Fig. 5

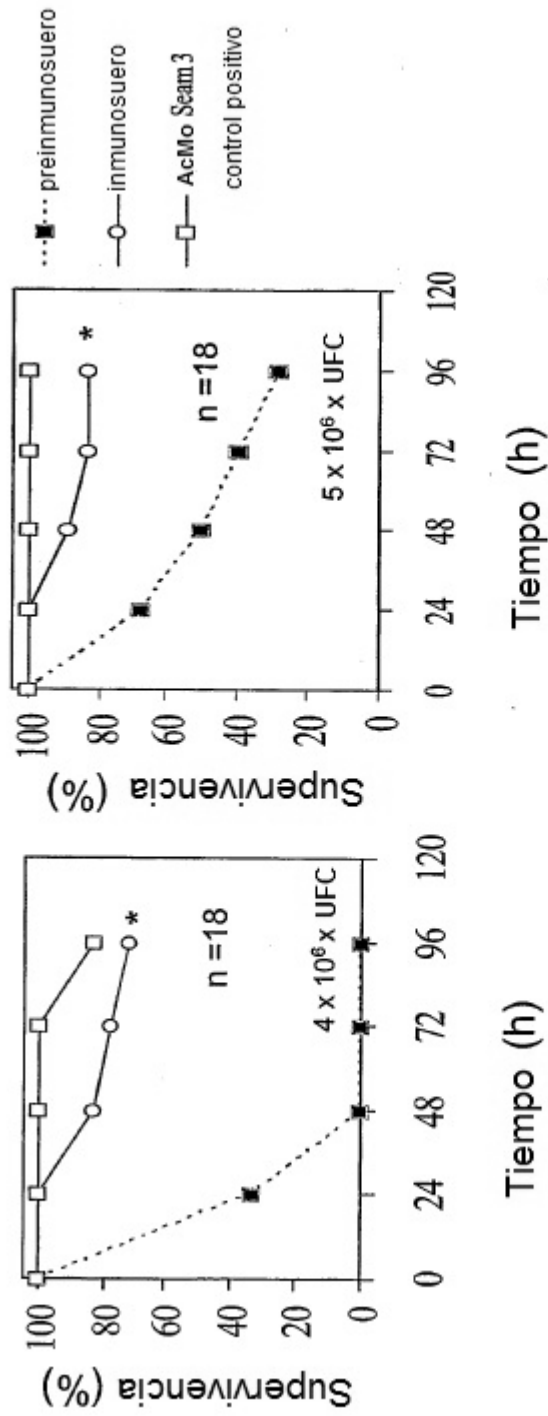


Fig. 6

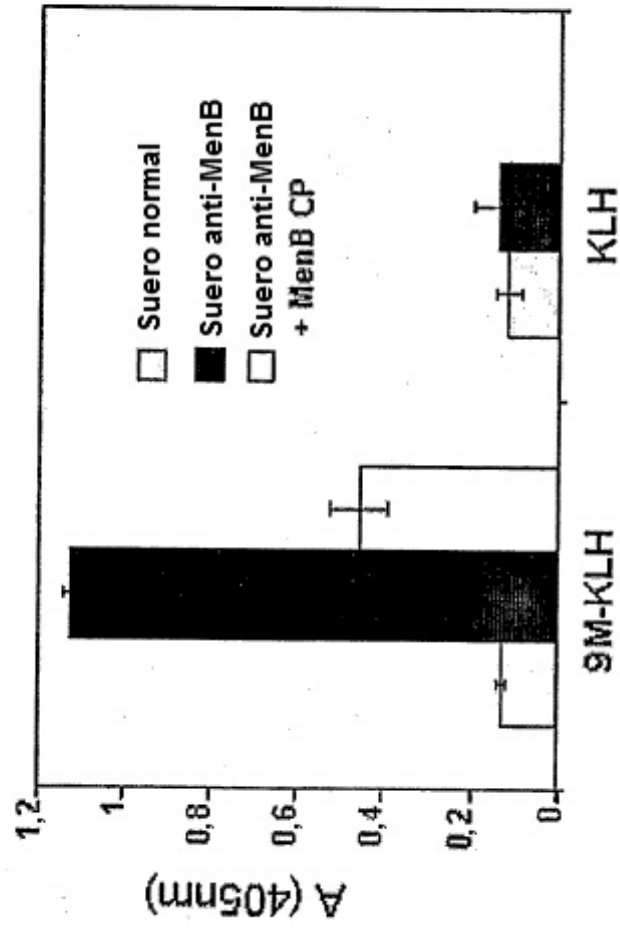


Fig. 7

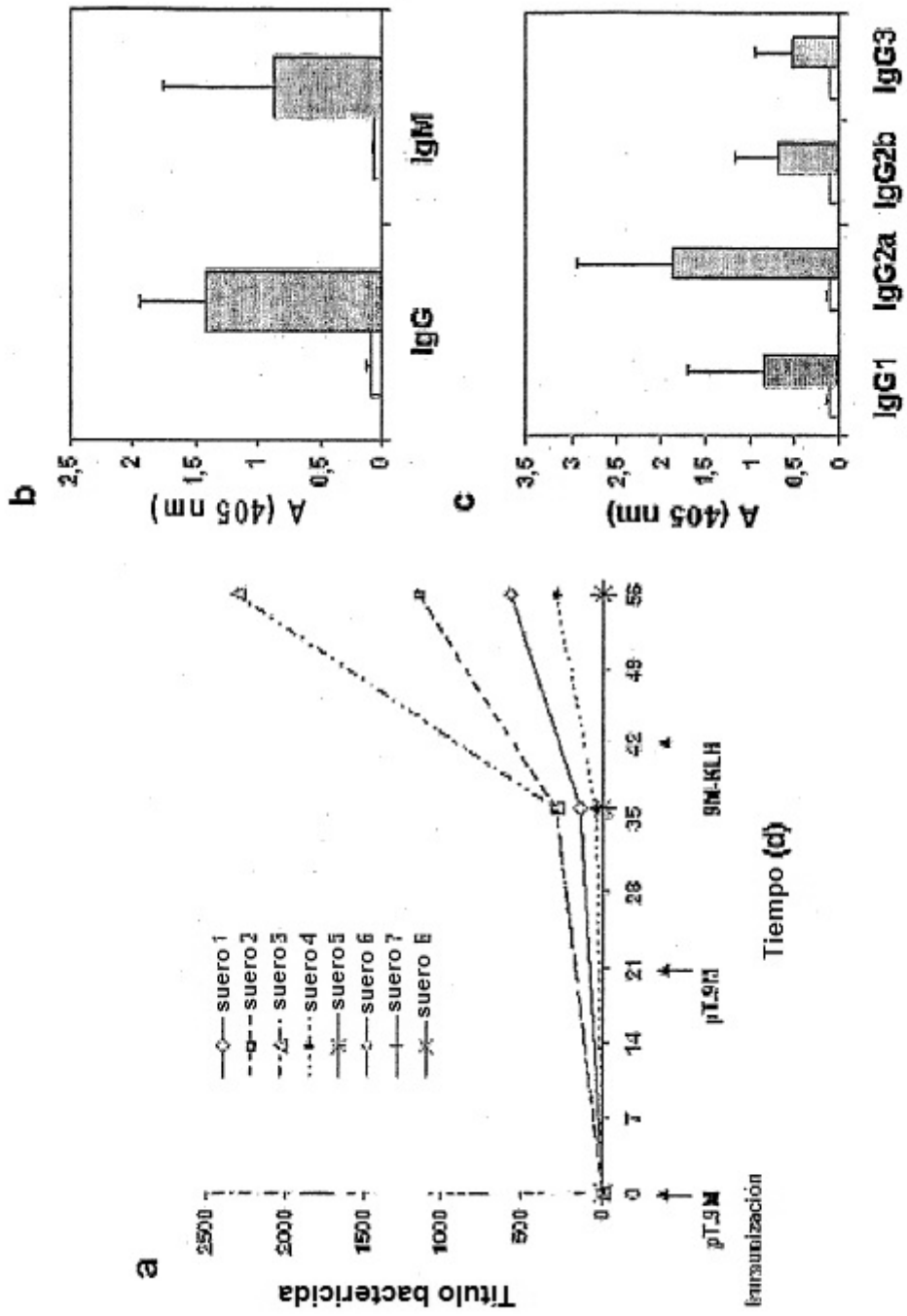


Fig. 8