

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 592**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/104 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2003** **E 07012893 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 1864679**

54 Título: **Vesículas de membranas externas bacterianas mejoradas**

30 Prioridad:

30.08.2002 GB 0220194

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

06.08.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)**

**VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT**

72 Inventor/es:

**PIZZA, MARIAGRAZIA;
SERRUTO, DAVIDE y
RAPPUOLI, RINO**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 483 592 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vesículas de membranas externas bacterianas mejoradas

5 CAMPO TÉCNICO

Esta invención pertenece al campo de la preparación de vesículas para fines de inmunización.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Una de las diversas aproximaciones a la inmunización frente a una infección de *N. meningitidis* es usar vesículas de membranas externas (OMVs). Una vacuna de OMV eficaz frente al serogrupo B ha sido producida por el instituto Nacional Noruego de la Sanidad Pública [por ejemplo, referencia 1] pero, aunque esta vacuna es segura y previene la enfermedad MenB, su eficacia está limitada a la cepa usada para preparar la vacuna.

15 La vacuna "RIVM" está basada en vesículas que contienen seis subtipos diferentes de PorA y se ha mostrado que es inmunógena en niños en ensayos clínicos de fase II. [2].

20 La referencia 3 describe una vacuna contra diferentes serotipos patógenos de meningococo del serogrupo B basada en OMV que retiene un complejo de proteínas de 65 kDa. La referencia 4 describe una vacuna que comprende OMV de cepas meningocócicas tratadas por ingeniería genética, en las que las OMVs comprenden: al menos una proteína de membrana externa (OMP) de clase 1 pero que no comprende OMP de clase 2/3. La referencia 5 describe OMVs que comprenden OMPs que tienen mutaciones en sus bucles superficiales y OMVs que comprenden derivados de lipopolisacárido meningocócico (LPS).

25 La referencia 6 describe composiciones que comprenden OMVs complementadas con proteínas de unión de transferrina (por ejemplo, TbpA y TbpB) y/o superóxido-dismutasa Cu, Zn. La referencia 7 describe composiciones que comprenden OMVs complementadas con diversas proteínas. La referencia 8 describe preparaciones de vesículas de membranas obtenidas a partir de *N. meningitidis* con un gen furK modificado.

30 Además de *N. meningitidis* del serogrupo B, han sido preparadas vesículas a partir de otras bacterias. La referencia 9 describe un procedimiento para preparar vacunas basadas en OMV para meningococos del serogrupo A. Las referencias 10 y 11 describen vesículas a partir de *N. gonorrhoeae*. La Referencia 12 describe preparaciones de vesículas a partir de *N. lactamica*. Han sido preparadas también vesículas a partir de *Moraxella catarrhalis* [13,14], *Shigella flexneri* [15,16], *Pseudomonas aeruginosa* [15,16], *Porphyromonas gingivalis* [17], *Treponema pallidum* [18], *Haemophilus influenzae* [19 y 20] y *Helicobacter pylori* [21].

35 Un inconveniente de las preparaciones de vesículas bacterianas es que no están presentes agentes protectores importantes. Para retener antígenos como nspA en preparaciones de OMV, la referencia 20 expone que la expresión de NspA debe ser sobreexpresada con una desactivación concomitante de porA y cps. Es un objeto de la invención proporcionar preparaciones de vesículas adicionales y mejoradas, junto con procedimientos para su elaboración. En particular, es un objeto de la invención proporcionar vesículas que retengan componentes inmunógenos bacterianos importantes a partir de *N. meningitidis*.

45 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

50 Los métodos de la técnica anterior para la preparación de OMV meningocócicos incluyen el uso de un detergente durante la rotura de la membrana bacteriana [por ejemplo, véase la referencia 22, en la que se usa un detergente de desoxicolato]. La invención está basada en el descubrimiento sorprendente de que la rotura de la membrana sustancialmente en ausencia de detergente da lugar a OMVs que retienen importantes componentes inmunógenos bacterianos, particularmente (i) la proteína de superficie de NspA protectora, (ii) la proteína "287" y (iii) la proteína "741".

55 Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para la elaboración de una preparación de vesículas de membranas externas a partir de una bacteria, en la que la membrana de bacteria es rota sustancialmente en ausencia de detergente. Se proporcionan también preparaciones de OMVs que pueden ser obtenidas mediante procedimientos de la invención.

60 Para la obtención de vesículas de NspA⁺, el procedimiento de la invención es mucho más sencillo que realizar las múltiples manipulaciones genéticas descritas en la referencia 20.

65 El procedimiento de la invención incluirá normalmente las siguientes etapas básicas (a) tratar células bacterianas en ausencia sustancial de detergente; (b) centrifugar la composición de la etapa (a) para separar las vesículas de las membranas externas de las células tratadas y el debris celular y recoger la materia sobrenadante; (c) realizar una centrifugación a velocidad elevada de la materia sobrenadante de la etapa (b) y recoger las vesículas de membranas externas en un sedimento; (d) volver a dispersar el sedimento de la etapa (c) en un tampón; (e)

realizar una segunda centrifugación a velocidad elevada de acuerdo con la etapa (c) recogiendo las vesículas de membranas externas en un sedimento; (f) volver a dispersar el sedimento de la etapa (e) en un medio acuoso.

5 El procedimiento puede comprender también las siguientes etapas: (g) realizar una filtración en condiciones estériles a través de al menos dos filtros de tamaño de poros decreciente de la composición nuevamente dispersada de la etapa (f); y (h) opcionalmente, incluir la composición de la etapa (g) en un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una composición adyuvante.

10 La etapa (a) da lugar a vesículas de la membrana externa bacteriana, y las vesículas comprenden generalmente componentes de la membrana externa sustancialmente en su forma nativa. Ventajosamente, son conservados los componentes de membranas de NspA "287" y "741".

15 La etapa (b) incluirá normalmente una centrifugación a aproximadamente 5.000-10.000 g durante hasta 1 hora.

Las etapas (c) y (e) incluirán normalmente una centrifugación a aproximadamente 35.000-100.000 g durante hasta 2 hora.

20 Las etapas de centrifugación son realizadas preferentemente entre 2°C y 8°C.

Puede ser usado cualquier tampón adecuado en la etapa (b) por ejemplo, tampón Tris, tampón de fosfato, tampón de histidina etc. La etapa (f) puede incluir también el uso de un tampón que puede ser el mismo tampón usado en la etapa (d) o puede incluir sencillamente el uso de agua (por ejemplo, agua para inyección).

25 La etapa (g) finaliza preferentemente con un filtro con un tamaño de poros de aproximadamente 0,2 µm.

La invención proporciona también una composición de vesículas de *N. meningitidis* caracterizada porque las vesículas incluyen (i) proteína de NspA, (ii) proteína "287" y (iii) proteína "741".

30 La bacteria

La bacteria a partir de la cual son preparadas las OMVs puede ser gram-positiva, pero es preferentemente gram-negativa. La bacteria puede ser del género *Moraxella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Treponema*, *Porphyromonas* o *Helicobacter*, (véase lo que antecede para las especies preferidas) pero es preferentemente del género *Neisseria*. Las especies preferidas de *Neisseria* son *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Dentro de la *N. meningitidis*, puede ser usado cualquiera de los serogrupos A, C, W135 e Y, pero es preferido preparar vesículas a partir del serogrupo B. Las cepas preferidas dentro del serogrupo B son MC58, 2996, H4476 y 394/98.

40 Para reducir la actividad pirógena, es preferido que la bacteria tenga bajos niveles de endotoxinas (LPS). Son conocidas bacterias mutantes adecuadas, por ejemplo, *Neisseria* mutante [23] y *Helicobacter* mutante [24]. Los procedimientos para preparar membranas externas agotadas en LPS a partir de bacterias gram-negativas se describen en la referencia 25.

45 La bacteria puede ser una bacteria de tipo salvaje o puede ser una bacteria recombinante. Las bacterias recombinantes preferidas sobreexpresan (con relación a la correspondiente cepa de tipo salvaje) inmunógenos como NapA, 287,741, TbpA, TbpB, superóxido dismutasa [6] etc. La bacteria puede expresar más de una proteína de membrana externa de clase I PorA, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6 de subtipos de PorA: P1.7,16; P1.5,2; P1.19,15; P15c,10; P1.12,13; y P1.7h,4, [por ejemplo, referencias 26 y 27].

50 El procedimiento de la invención incluirá normalmente una etapa inicial de cultivo de las bacterias, opcionalmente seguida de una etapa de concentración de las células cultivadas.

Rotura de membranas

55 La rotura de membranas para la formación de vesículas es realizada sustancialmente en ausencia de detergente.

En particular, la rotura de membranas puede ser realizada sustancialmente en ausencia de un detergente de desoxicolato, estando presente opcionalmente otros detergentes.

60 La rotura de membranas puede ser realizada sustancialmente en ausencia de un detergente iónico, estando presente opcionalmente un detergente no iónico. Alternativamente, puede ser realizada sustancialmente en ausencia de un detergente no iónico, estando presente opcionalmente un detergente iónico. En algunas realizaciones, tampoco está presente un detergente no iónico.

65

Las etapas después de la rotura de membranas y formación de vesículas pueden incluir el uso de un detergente. Por tanto, está abarcado por la invención un procedimiento en el que se produce una rotura de membranas en ausencia de detergente, pero en el que es posteriormente añadido un detergente a las vesículas preparadas.

La expresión “sustancialmente en ausencia” significa que el detergente en cuestión está presente a una concentración de más de 0,05% (por ejemplo, $\leq 0,025\%$, $\leq 0,015\%$, $\leq 0,010\%$, $\leq 0,005\%$, $\leq 0,002\%$, $\leq 0,001\%$ o incluso 0%) durante la rotura de membranas. Por tanto, no están excluidos procedimientos en los que están presentes cantidades residuales de detergentes durante la preparación de las vesículas.

La rotura de membranas en ausencia de detergente puede ser realizada sobre bacterias intactas usando técnicas físicas, por ejemplo, aplicación de ultrasonidos, homogeneización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, trituración, prensa francesa, combinación, etc.

15 Las vesículas

Los procedimientos de la invención producen vesículas de membranas externas. Las OMVs son preparadas a partir de la membrana externa de bacterias cultivadas. Son obtenidas a partir de bacterias crecidas en un caldo o en un cultivo en medio sólido, preferentemente separando las células bacterianas del medio de cultivo (por ejemplo, por filtración o mediante centrifugación a baja velocidad para sedimentar las células), lisado de las células (sin detergente) y separación de una fracción de membranas externas de moléculas citoplásmicas (por ejemplo, por filtración, por precipitación diferencial o agregación de membranas externas y/o OMVs, mediante métodos de separación por afinidad usando ligandos que reconocen específicamente moléculas de membranas externas, o mediante centrifugación a velocidad elevada que sedimenta las membranas externas y/o OMVs).

Las OMVs pueden ser distinguidas de las microvesículas (MVs [28]) y las “OMVs nativas” (“NOMVs [66]), que son vesículas de membranas que se producen de forma natural, que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y son liberadas en el medio de cultivo. Las MVs pueden ser obtenidas cultivando *Neisseria* en un medio de cultivo de caldo, separando las células completas del medio de cultivo (por ejemplo, por filtración o por centrifugación a baja velocidad, para sedimentar solamente las células y no las ampollas más pequeñas) y recogiendo las MVs que están presentes en el medio agotado en células (por ejemplo, por filtración, por precipitación diferencial o agregación de MVs, por centrifugación a velocidad elevada para sedimentar las MVs). Las cepas para ser usadas en la producción de MVs pueden ser generalmente seleccionadas sobre la base de la cantidad de MVs producidas en cultivo. Las referencias 29 y 30 describen *Neisseria* con una elevada producción de MV.

Componentes inmunógenos bacterianos retenidos

La ausencia sustancial de detergente en los procedimientos de la invención da lugar a preparaciones de vesículas que retienen componentes inmunógenos de la superficie bacteriana que, de otra forma, usando métodos de la técnica anterior basados en detergentes, serían perdidos o disminuidos. En *N. meningitidis*, tres inmunógenos que son ventajosamente retenidos usando la invención incluyen: (1) NspA; (2) proteína “741” y (3) proteína “287”. De acuerdo con la presente invención la “741” se retiene.

La NspA (proteína A de superficie de *Neisseria*) es descrita en las referencias 31 a 37 y como la SEQ ID 40008-4033 de la referencia 38. Es una vacuna candidata para la prevención de una enfermedad meningocócica. Está altamente conservada entre las cepas. Sin embargo, a pesar de una esperanza inicial, se cree actualmente que la NspA no será un antígeno protector adecuado por sí mismo y necesitará ser administrada con antígenos adicionales [por ejemplo, la referencia 36 y ejemplo 11 de la referencia 38]. La NspA se ha encontrado que es separada mediante métodos de preparación basados en detergentes de la técnica anterior. Sin embargo, según la presente invención, la NspA puede ser retenida en las vesículas. Las vesículas de NspA+ve son ventajosas porque es preparada una combinación de dos inmunógenos potentes conocidos (es decir, vesículas + NspA) en un único procedimiento, y cada inmunógeno aumenta la eficacia del otro.

La proteína “741” es descrita como “NMB1870” en la referencia 39 (GenBank AAF42204, GI:7227128). Es descrita también en las referencias 40 y 41. Provoca fuertes anticuerpos bactericidas. Se ha encontrado que la proteína “741” es parcialmente suprimida en vesículas preparadas mediante métodos basados en detergente de la técnica anterior. Sin embargo, según la presente invención, la “741” puede ser retenida en las vesículas. Estas vesículas 741+ve son ventajosas porque una combinación de dos potentes inmunógenos (es decir, vesículas +741) es preparada en un único procedimiento, y cada inmunógeno aumenta la eficacia del otro.

La proteína “287” es descrita como “NMB2132” en la referencia 39 (GenBank AAF42440, GI:7227388). Es descrita también en las referencias 40 y 42. Provoca fuertes anticuerpos bactericidas. La proteína “287” normalmente no está presente en vesículas preparadas mediante métodos basados en detergente de la técnica anterior y, para superar su supresión, ha sido previamente propuesto que las preparaciones de OMV pueden ser complementadas con 287 [43]. Sin embargo, según la presente invención, la “287” puede ser retenida en las

vesículas. Estas vesículas de 287+ve son ventajosas porque una combinación de dos potentes inmunógenos (es decir, vesículas +287) es preparada en un único procedimiento, en el que cada inmunógeno aumenta la eficacia del otro.

5 La NspA preferida (a) tiene al menos un a% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos GI: 1518522 y/o (b) comprende un fragmento de al menos x aminoácidos de la secuencia de aminoácidos GI: 1518522. La "741" preferida (s) tiene al menos b% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos GI: 7227128 y/o (b) comprende un fragmento de al menos x aminoácidos de la secuencia de aminoácidos GI: 7227128. La "287" preferida (a) tiene al menos un c% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos GI: 7227388 y/o (b) comprende un fragmento de al menos x aminoácidos de la secuencia de aminoácidos GI: 7227388. Los valores de a, b y c son independiente unos de otros, pero cada valor es al menos 70 (por ejemplo, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 ó 100). Los valores x, y y z son independientes unos de otros, pero cada valor es al menos 8 (por ejemplo, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 etc.). Los fragmentos comprenden preferentemente epítotos.

15 Las proteínas NspA, 287 y 741 preferidas retienen sustancialmente la capacidad de las proteínas de tipo salvaje (como se encuentra en las bacterias intactas) para hacer surgir anticuerpos bactericidas en pacientes.

20 Composiciones farmacéuticas inmunógenas

El procedimiento de la invención proporciona una preparación de vesículas. Para una administración a un paciente, las vesículas son formuladas preferentemente en forma de composiciones inmunógenas y, más preferentemente en forma de composiciones adecuadas para ser usadas como una vacuna en seres humanos (por ejemplo, niños o adultos). Las vacunas de la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir una infección) o terapéuticas (es decir, para tratar una enfermedad después de una infección), pero normalmente serán profilácticas.

La composición de la invención está preferentemente esterilizada.

30 La composición de la invención está preferentemente exenta de agentes pirogénos.

La composición de la invención tiene generalmente un pH entre 6,0 y 7,0, más preferentemente entre 6,3 y 6,9, por ejemplo, $6,6 \pm 0,2$. La composición está preferentemente tamponada a este pH.

35 Otros componentes adecuados para una administración a seres humanos se describen en la referencia 44.

La composición comprenderá generalmente un adyuvante. Los adyuvantes preferidos para aumentar la eficacia de la invención incluyen, pero sin limitación: (A) MF59 (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formulados en forma de partículas submicrónicas usando un microfluidizador) [véase el capítulo 10 de la referencia 45; véase también la referencia 46]; (B) micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30 µm de diámetro y lo más preferentemente ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un poli(ácido hidroxibutírico) un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), siendo preferido un poli(láctido-co-glicólido) opcionalmente con materiales de carga superficiales (por ejemplo, añadiendo un detergente catiónico, aniónico o no iónico como SDS (negativo) o CTAB (positivo) [por ejemplo, referencias 47 y 48]; (C) liposomas [véase los capítulos 13 y 14 de la referencia 45]; (D) IS-COMs [véase el capítulo 45 de la referencia 45], que pueden estar desprovistos de detergentes adicional [49]; (E) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 de bloques plurónicos y thr-MDP, microfluidizado en forma de una emulsión submicrónica o centrifugado para generar una emulsión de tamaño de partículas mayor [véase el capítulo 12 de la referencia 45]; (F) sistema adyuvante Ribit® (RAS), (Eibi immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de paredes celulares bacterianas del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y estructura principal de las paredes celulares (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox®); (G) adyuvantes de saponina, como QuilA o QS21 [véase el capítulo 22 de la referencia 45] también conocido como estimulon®; (H) quitosano [por ejemplo, 50]; (I) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (J) citoquinas, como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón-γ), factor de estimulación de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc. [véanse los capítulos 27 y 28 de la referencia 45]; (K) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [51]; (L) monofosforil-lípidoA (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) [por ejemplo, capítulo 21 de la referencia 45]; (M) combinaciones de 3sMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [52]; (N) oligonucleótidos que comprenden restos CpG [53], es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, siendo usada opcionalmente 5-metilcitosina en lugar de citosina; (O) un polioxietileno-éter o un polioxietileno-éster [54]; (P) un tensioactivo de éster de polioxietileno-sorbitán en combinación con un octoxinol [55] o un polioxietileno-alquil-éter o un ten-sioactivo de éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional como un octoxinol [56]; (Q) un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un poligonucleótido CpG) y una saponina [57]; (R) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica [58]; (S) una saponina y una emulsión de aceite en agua [59]; (T) enterotoxina lábil respecto al calor de E. coli ("LT") o sus mutantes des-toxicados, como

los mutantes K63 o R72 [por ejemplo, capítulo 5 de la referencia 60]; (U) toxina del cólera ("CT") o sus mutantes destoxificados [por ejemplo, capítulo 5 de la referencia 60]; (V) RNA de cadena doble; (W) sales de aluminio, como hidróxidos de aluminio (incluidos los oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluidos los hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc. [Capítulos 8 y 9 de la referencia 61]; (X) emuladores de monofosforil-lípidos A, como derivados de aminoalquil-glucosaminida-fosfato, por ejemplo, RC-529 [62]; (Y) polifosfazeno (PCCPP); o (Z) un bioadhesivo [63] como microesferas de ácido hialurónico esterificado [64] o un mucoadhesivo seleccionado entre el grupo que consiste en derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. Pueden ser usadas también otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para aumentar la eficacia de la composición [por ejemplo, véase el capítulo 7 de la referencia 45]. Las sales de aluminio (especialmente los fosfatos y/o hidróxidos de aluminio) son adyuvantes preferidos para una inmunización parenteral. Las toxinas mutantes son preferidas para los adyuvantes mucosales.

Las vesículas en las composiciones de la invención estarán presentes en "cantidades inmunológicamente eficaces", es decir, la administración de esa cantidad a un individuo, en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención de la enfermedad. Esta cantidad varía dependiendo del estado de salud y físico del individuo que va a ser tratado, como la edad, el grupo taxonómico del individuo que va a ser tratado (por ejemplo, un primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración del facultativo encargado de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado a través de ensayos rutinarios. El tratamiento mediante la dosificación puede seguir un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiples (por ejemplo, que incluyan dosis estimuladoras). La vacuna puede ser administrada conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores.

Normalmente, las composiciones de la invención son preparadas en formas inyectables. El suministro directo de las composiciones será generalmente por vía parenteral (por ejemplo, por inyección, ya sea subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o suministrada al espacio intersticial de un tejido) o mucosal (por ejemplo, oral o intranasal [65, 66]). Las composiciones pueden ser administradas también en una lesión.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente al sujeto. Los sujetos que van a ser tratados pueden ser animales; en particular, pueden ser tratados sujetos humanos. Las vacunas son particularmente útiles para vacunar niños y adolescentes.

La composición puede comprender vesículas de más de un serosubtipo de *N. meningitidis* [28]. Análogamente, la composición puede comprender más de un tipo de vesícula, por ejemplo, tanto MVs como OMVs.

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

- antígenos de *Helicobacter pylori* como CagA [67 a 70], VacA [71, 72], NAP [73, 74, 75], HopX [por ejemplo, 76], HopY [por ejemplo, 76] y/o ureasa.
- un antígeno de sacárido del serogrupo de *N. meningitidis* A, C, W135 y/o Y, como el oligosacárido descrito en la referencia 77 del serogrupo C [véase también la referencia 78] o el oligosacárido de la referencia 79;
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 80, 81, 82];
- un antígeno del virus de la hepatitis A, como un virus inactivado [por ejemplo, 83, 84];
- un antígeno del virus de la hepatitis B, como los antígenos de la superficie y/o el núcleo [por ejemplo, 84, 85];
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, como holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo 86 y 87];
- un antígeno de la difteria como toxoide de difteria [por ejemplo, capítulo 3 de referencia 88] por ejemplo, el mutante CRM197 [por ejemplo, 89];
- un antígeno del tétanos, como un toxoide del tétanos [por ejemplo, capítulo 4 de referencia 108];
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae B* [por ejemplo, 78];
- un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo, 90];
- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 91, 92, 93, 94];
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, referencias 95 a 101];
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 102];
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 103];
- antígeno(s) de la polio [por ejemplo, 104, 105] como OPV o, preferentemente, IPV;
- antígeno(s) de la rabia [por ejemplo, 106] como virus inactivados liofilizados [por ejemplo, 107, RabAvert®];
- antígenos del sarampión, paperas y/o rubeola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la referencia 108];
- antígeno(s) de la gripe [por ejemplo, capítulo 19 de la referencia 108], como las proteínas de superficies de hemaglutinina y/o neuraminidasa;
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 109];

- un antígeno de proteína de *Streptococcus agalactie* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 110, 111];
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus agalactie* (estreptococo del grupo B);
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo, 111, 112, 113];
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 114];
- un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo, 115, 116, 117];
- un antígeno de un virus de la familia de las flaviviridae (genero flavivirus), como el virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis Japonesa, cuatro serotipos de virus dengue, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas o virus del Nilo occidental;
- un antígeno de pestivirus, como el virus de la fiebre porcina clásica, virus de la diarrea vírica bovina y/o virus de la enfermedad de la frontera;
- un antígeno de parvovirus, por ejemplo, de parvovirus B 19;
- una proteína priónica (por ejemplo, la proteína priónica CJD);
- una proteína amiloide, como un beta-péptido [118];
- un antígeno del cáncer, como los recogidos en la Tabla 1 de la referencia 119 o en las Tablas 3 y 4 de la referencia 120.

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

Los antígenos de proteínas tóxicas pueden ser destoxificados cuando sea necesario (por ejemplo, destoxicación de toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [87]).

Cuando un antígeno de difteria es incluido en la composición, es preferido incluir también antígeno de tétanos y antígenos de pertussis. Análogamente, cuando un antígeno de tétanos es incluido, es preferido incluir también antígenos de difteria y de pertussis. Análogamente, cuando es incluido un antígeno de pertussis, es preferido incluir también antígenos de difteria y de tétanos. Por tanto, son preferidas combinaciones de DTP.

Los antígenos de sacáridos están preferentemente en la forma de conjugados. Las proteínas portadoras para los conjugados incluyen la proteína de membranas externas de *N. meningitidis* [121], péptidos sintéticos [122,123], proteínas de choque con calor [124,125], proteínas de pertussis [126,127], proteína D de *H. influenzae* [128], citoquinas [129], lipoquinas [129], hormonas [129], factores de crecimiento [129], toxina A o B de *C. difficile* [130], proteínas de absorción de hierro [131], etc. Una proteína portadora preferida es el toxoide de difteria CRM197 [132].

Los antígenos del serogrupo B de *N. meningitidis* pueden ser añadidos también a las composiciones de OMV. En particular, puede ser añadido un antígeno como el descrito en las referencias 133 a 139.

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

Como una alternativa para usar antígenos de proteínas en la composición de la invención, puede ser usado un ácido nucleico que codifique el antígeno. Los componentes proteicos de las composiciones de la invención, por tanto, pueden ser sustituidos con un ácido nucleico (preferentemente DNA, por ejemplo, en la forma de un plásmido) que codifique la proteína.

Medicamentos

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

La invención también proporciona composiciones como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de hacer surgir una respuesta inmune en un paciente, que comprende administrar a un paciente una composición de la invención. La respuesta inmune es preferiblemente protectora contra la enfermedad meningocócica, y puede comprender una respuesta inmune humoral y/o una respuesta inmune celular. El paciente es preferiblemente un niño.

El método puede producir una respuesta de refuerzo, en un paciente que ha sido ya cebado contra la *N.meningitidis*. Los regímenes de cebado/refuerzo subcutáneo e intranasal para OMVs se describen en la ref. 65.

La invención también proporciona el uso de una vesícula de la invención en la elaboración de un medicamento para hacer surgir una respuesta inmune en un paciente. El medicamento es preferiblemente una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna). El medicamento es preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por una *Neisseria* (por ejemplo, meningitis, septicemia, gonorrea, etc.).

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

Formulación de OMV

La invención proporciona una composición que comprende vesículas de membranas externas meningocócicas, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un tampón de histidina y cloruro de sodio, en el cual: (a) la concentración de cloruro de sodio es mayor que 7,5 mg/ml; y/o (b) la concentración de OMVs es menor que 100 µg/ml.

La concentración de cloruro de sodio es preferentemente mayor que 8 mg/ml, y es más preferentemente de forma aproximada 9 mg/ml.

La concentración de OMVs es preferentemente menor que 75 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 50 mg/ml.

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

El adyuvante puede ser usado a aproximadamente 3,3 mg/ml (expresada como concentración de Al³⁺).

Definiciones

Las referencias al porcentaje de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología de la identidad de secuencias pueden ser determinados usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 140. Una alineación preferida es determinada mediante el algoritmo de búsqueda de homologías de Smith-Waterman usando una búsqueda de espacios de afinado con una penalización de espacios abiertos de 12 y una penalización de la extensión de los espacios de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homologías de Smith-Waterman es bien conocido y está descrito en la referencia 141.

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

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

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente” por ejemplo, una composición que está “sustancialmente exenta” de Y puede estar completamente exenta de Y. cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede ser omitida de la definición de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1 y 2 muestran la presencia/ausencia de (1) proteína “287” y (2) proteína “741” en bacterias (“TOT”) y vesículas de membranas externas (“OMV”) preparadas a partir de las cepas MC58, H4476 y 394/98 de *N. meningitidis*. La flecha muestra la posición de “287” en la Figura 1 y “741” en la Figura 2.

La Figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos de las entradas de GenBank GI: 7227128, GI: 7227388 y GI: 1518522 de fecha de 29 de agosto de 2002.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION**Preparación de OMV**

Fueron preparadas OMVs mediante métodos “noruegos” de la técnica anterior (cepas H4476 y 394/98) o mediante el siguiente procedimiento (cepa MC58):

- Fueron recogidas bacterias de 2-5 placas en 10 ml de tampón de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y fueron destruidas con calor a 56°C durante 45 minutos. Las muestras fueron seguidamente sometidas a ultrasonidos en hielo (ciclo de funcionamiento 50 durante 10 minutos con la punta a 6/7) para romper las membranas.
- El debris celular fue separado por centrifugación a 5.000 g durante 30 minutos a 4°C, o a 10.000 g durante 10 minutos.
- La materia sobrenadante fue nuevamente centrifugada a 50.000 g durante 75 minutos a 4°C.
- El sedimento se volvió a poner en suspensión en 7 ml sarcosinato de N-lauroilo al 2% (Sarcosil) en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) durante 20 minutos a temperatura ambiente para solubilizar las membranas citoplásmicas.
- La muestra fue centrifugada a 10.000 g durante 10 minutos para separar las partículas y la materia sobrenadante fue centrifugada a 75.000 g durante 75.000 minutos a 4°C. La muestra fue lavada en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y centrifugada a 75.000 g durante 75 minutos.
- El sedimento se volvió a poner en suspensión en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) o agua destilada.

Las bacterias y las preparaciones de OMV fueron ensayadas mediante una transferencia Wes-tern en presencia de NspA, 287 y 741 (Figuras 1 y 2) y los resultados se resumen en la siguiente Tabla:

Cepa	Detergente	NspA		287		741	
		Bacteria	OMV	Bacteria	OMV	Bacteria	OMV
MC58	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H44/76	+	+++	-(20)	+++	-	+++	+
394/98	+	+++	n.d.	+++	+++	+++	+

5 En contraste con los métodos basados en detergentes de la técnica anterior, por lo tanto, la ausencia de detergente da lugar a que la NspA este retenida en las OMVs y evite la pérdida de 287 y 741.

Formulación de OMVs preparadas a partir de cepa de Nueva Zelanda de MenB

10 Se prepararon OMVs a partir de cepa de serogrupo B 394/98 de *N. meningitidis*. Estas fueron formuladas de dos formas diferentes, en las que los componentes tenían las siguientes concentraciones:

Cepa	Detergente	NspA		287		741	
		Bacteria	OMV	Bacteria	OMV	Bacteria	OMV
MC58	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H44/76	+	+++	-(20)	+++	-	+++	+
394/98	+	+++	n.d.	+++	+++	+++	+

La formulación "B" se encontró que era inmunológicamente superior a la formulación "A". La formulación "B" difiere de la descrita en la referencia 142 por tener la mitad de la concentración de OMV y una mayor concentración de NaCl, y un pH ligeramente diferente.

15 REFERENCIAS

- [1] Bjune et al. (1991) Lancet 338 (8775): 1093-1096.
 [2] de Kleijn et al. (2001) Vaccine 20 : 352-358.
 [3] Patentes de EE.UU. 5,597, 572 y 5, 747,653; véase también patente europea 0301992.
 20 [4] Patente europea 0449958 (concedida a partir de WO90/06696).
 [5] Patente de EE.UU. 5,705, 161; véase también WO94/08021.
 [6] Solicitud de patente internacional WO00/25811.
 [7] Solicitud de patente internacional WO01/52885.
 [8] Solicitud de patente internacional WO98/56901.
 25 [9] Solicitud de patente internacional WO01/91788.
 [10] Parmaretal. (1997) Vaccine 15: 1641-1651.
 [11] Solicitud de patente internacional WO99/59625.
 [12] Solicitud de patente internacional WO00/50074.
 [13] Patentes de EE.UU. 5,552, 146,5, 981, 213 y 5, 993,826; véase también WO93/03761.
 30 [14] Zhou et al. (1998) FEMS Microbiol Lett 163: 223-228.
 [15] Kadurugamuwa y Beveridge (1999) Microbiology 145: 2051-2060.
 [16] Solicitud de patente internacional WO97/05899.
 [17] Kesavalu et al. (1992) Infect. Immun. 60: 1455-1464.
 [18] Blanco et al. (1999) J. Immunol 163 : 2741-2746.
 35 [19] Solicitud de patente internacional WO01/09350.
 [20] Solicitud de patente internacional WO02/09746.
 [21] Keenan et al. (1998) FEMS Microbiol Lett 161 : 21-27.
 [22] Patente europea 0011243.
 [23] Solicitud de patente internacional WO99/10497.
 40 [24] Solicitud de patente internacional WO02/07763.
 [25] Patente europea 0624376.
 [26] Claassen et al. (1996) Vaccine 14: 1001-1008.

- [27] Peeters et al. (1996) *Vaccine* 14: 1009-1015.
- [28] Solicitud de patente internacional WO02/09643.
- [29] Patente de EE.UU. 6,180,111.
- [30] Solicitud de patente internacional WO01/34642.
- 5 [31] Martin et al. (1997) *J. Exp. Med.* 185: 1173-1183.
- [32] Plante et al. (1999) *Infect. Immun.* 67: 2855-2861.
- [33] Cadieux et al. (1999) *Infect. Immun.* 67: 4955-4959.
- [34] Moe et al. (1999) *Infect. Immun.* 67: 5664-5675.
- [35] Martin et al. (2000) *J. Biotechnol.* 83: 27-31.
- 10 [36] Moe et al. (2001) *Infect. Immun.* 69: 3762-3771.
- [37] Solicitud de patente internacional WO96/29412.
- [38] Solicitud de patente internacional WO00/71725.
- [39] Tettelin et al. (2000) *Science* 287: 1809-1815.
- [40] Solicitud de patente internacional WO99/57280.
- 15 [41] Solicitud de patente internacional WO03/020756 (SEQ IDs 1-22 en particular).
- [42] Solicitud de patente internacional WO00/66741.
- [43] Solicitud de patente internacional WO01/52885.
- [44] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [45] *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-20 44867-X).
- [46] WO90/14837.
- [47] WO02/26212.
- [48] WO98/33487.
- [49] WO00/07621.
- 25 [50] WO99/27960.
- [51] WO98/57659.
- [52] Solicitudes de patentes europeas 0835318,0735898 y 0761231.
- [53] Krieg (2000) *Vaccine* 19: 618-622; Krieg (2001) *Curr opin Mol Ther* 2001 3: 15-24; WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581 etc.
- 30 [54] WO99/52549.
- [55] WO01/2120.
- [56] WO01/21152.
- [57] WO00/6280.
- [58] WO00/23105.
- 35 [59] WO99/11241.
- [60] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, number 1.
- [61] *Vaccine Design* (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [62] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278.
- [63] Solicitud de patente internacional WO00/50078.
- 40 [64] Singh et al. (2001) *J. Cont. Rele.* 70: 267-276.
- [65] Bakke et al. (2001) *Infect. Immun.* 69: 5010-5015.
- [66] Katial et al. (2002) *Infect. Immun.* 70: 702-707.
- [67] Covacci y Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19: 587-592.
- [68] WO93/18150.
- 45 [69] Covacci et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
- [70] Tummuru et al. (1994) *Infect. Immun.* 61: 1799-1809.
- [71] Marchetti et al. (1998) *Vaccine* 16: 33-37.
- [72] Telford et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179: 1653-1658.
- [73] Evans et al. (1995) *Gene* 153 : 123-127.
- 50 [74] WO96/01272 y WO96/01273, especialmente SEQ ID NO: 6.
- [75] WO97/25429.
- [76] WO98/04702.
- [77] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10: 691-698.
- [78] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17: 1251-1263.
- 55 [79] Solicitud de patente internacional WO03/007985.
- [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 331-332.
- [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269-285, v.
- [82] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207.
- [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.
- 60 [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103: 321-326.
- [85] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl : S63-68 y 79-80.
- [86] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334: 349-355.
- [87] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9: 232-238.
- [88] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- 65 [89] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19: 1-70.
- [90] Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3: 901-915.

- [91] Solicitud de patente internacional WO99/24578.
 [92] Solicitud de patente internacional WO99/36544.
 [93] Solicitud de patente internacional WO99/57280.
 [94] Solicitud de patente internacional WO02/07924.
 5 [95] Solicitud de patente internacional WO02/02606.
 [96] Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21: 385-389.
 [97] Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 1397-406.
 [98] Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Suppl 3): S524-S527.
 [99] Solicitud de patente internacional WO99/27105.
 10 [100] Solicitud de patente internacional WO00/27994.
 [101] Solicitud de patente internacional WO00/37494.
 [102] Solicitud de patente internacional WO99/28475.
 [103] Ross et al. (2001) *Vaccine* 19: 4135-4142.
 [104] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 287-308.
 15 [105] Zimmerman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59: 113-118,125-126.
 [106] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl: S2-6.
 [107] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16; 47 (1): 12, 19.
 [108] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 [109] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1: S101-107.
 20 [110] Schuchat (1999) *Lancet* 353 (9146): 51-6.
 [111] Solicitud de patente internacional WO02/34771.
 [112] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 227-43, viii.
 [113] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 [114] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357 (9264): 1225-1240; véase también pages 1218-1219.
 25 [115] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39: 85-100.
 [116] Demicheli et al. (1998) *Vaccine* 16: 880-884.
 [117] Stepanov et al. (1996) *JBiotechnol* 44 : 155-160.
 [118] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24: 305-307.
 [119] Rosenberg (2001) *Nature* 411: 380-384.
 30 [120] Moingeon (2001) *Vaccine* 19: 1305-1326.
 [121] EP-A-0372501
 [122] EP-A-0378881
 [123] EP-A-0427347
 [124] WO93/17712
 35 [125] WO94/03208
 [126] WO98/58668
 [127] EP-A-0471177
 [128] WO00/56360
 [129] WO91/01146
 40 [130] WO00/61761
 [131] WO01/723
 [132] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002)
 [133] WO99/24578.
 [134] WO99/36544.
 45 [135] WO99/57280.
 [136] WO00/22430.
 [137] Tettelin et al. (2000) *Science* 287: 1809-1815.
 [138] WO96/29412.
 [139] Pizza et al. (2000) *Science* 287: 1816-1820.
 50 [140] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds. , 1987) Supplement 30.
 [141] Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* (1981) 2: 482-489.
 [142] WO03/009869.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la elaboración de una preparación de vesículas de membranas externas a partir de una bacteria Gram-negativa recombinante que sobre-expresa el inmunógeno 741, en el que la membrana bacteriana es sustancialmente rota en ausencia de detergente de desoxicolato.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la membrana bacteriana es sustancialmente rota en ausencia de cualquier detergente.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas básicas: (a) tratar células bacterianas en ausencia sustancial de detergente; (b) centrifugar la composición de la etapa (a) para separar las vesículas de las membranas externas de las células tratadas y el debris celular y recoger la materia sobrenadante; (c) realizar una centrifugación a velocidad elevada de la materia sobrenadante de la etapa (b) y recoger las vesículas de membranas externas en un sedimento; (d) volver a dispersar el sedimento de la etapa (c) en un tampón; (e) realizar una segunda centrifugación a velocidad elevada de acuerdo con la etapa (c) recogiendo las vesículas de membranas externas en un sedimento; (f) volver a dispersar el sedimento de la etapa (e) en un medio acuoso.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente las siguientes etapas: (g) realizar una filtración estéril a través de al menos dos filtros de tamaño de poros decreciente de la composición nuevamente dispersada de la etapa (f); y (h) opcionalmente incluir la composición de la etapa (g) en un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una composición adyuvante.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que la etapa (b) comprende una centrifugación a aproximadamente 5.000-10.000 g durante hasta 1 hora y las etapas (c) y (e) comprenden una centrifugación a aproximadamente 35.000-100.000 g durante hasta 2 horas.
- 25 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la rotura de membranas es por aplicación de ultrasonidos, homogeneización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, trituración, prensa francesa, combinación o cualquier otra técnica física.
- 30 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tampón usado en la etapa (d) y/o en la etapa (f) es un tampón de Tris, un tampón de fosfato o un tampón de histidina.
- 35 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la etapa (g) finaliza con un filtro de tamaño de poros de aproximadamente 0,2 µm.
- 40 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bacteria a partir de la cual son preparadas las OMVs es del género *Moraxella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Helicobacter* o *Neisseria*.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la bacteria es *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la bacteria es *N. meningitidis* del serogrupo B.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la bacteria es cepa MC58, 2996, H4476 ó 394/98.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente la etapa de formular una cantidad inmunológicamente eficaz de las OMVs como una composición inmunógena.
- 55 14. Una composición de OMV, que puede ser obtenida mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
15. La composición de la reivindicación 14, comprendiendo adicionalmente un adyuvante.
- 60 16. La composición de la reivindicación 15, que comprende un adyuvante(s) de hidróxido y/o fosfato de aluminio.
17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, para ser usada como un medicamento.
18. El uso de una composición de vesículas de membranas externas de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en la elaboración de un medicamento para hacer surgir una respuesta inmune en un paciente.

FIGURA 1

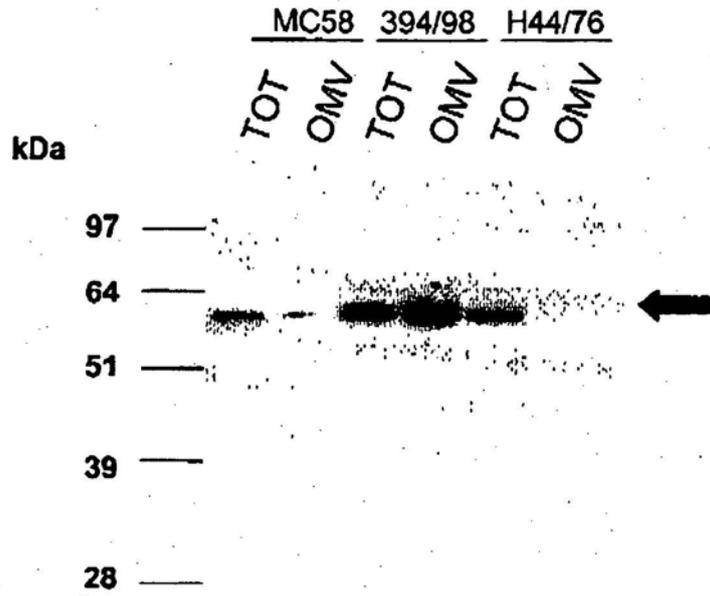


FIGURA 2

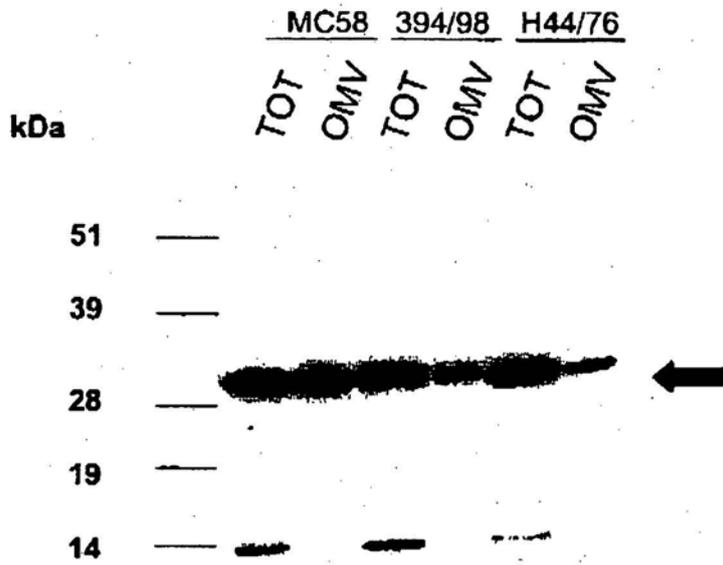


FIGURA 3**GI 7227128:**

MPSEPPFGRH LIFASLTCLI DAVCKKRYHN QNVYILSILR MTRSKPVNRT AFCCLSLITTA
 LILTACSSGG GGVAADIGAG LADALTAPLD HKDKGLQSLT LDQSVRKNEK LKLAAQGAEK
 TYNGDSLNT GKLNKDVSR FDFIRQIEVD GQLITLESGE FQVYKQSHSA LTAFOEQIQ
 DSEHSGKVA KRQFRIGDIA GEHTSFDKLP EGGRATYRGT AFGSDDAGGK LTYTIDFAAK
 QGNGKIEHLK SPELNVDLAA ADIKPDGKRH AVISGSVLYN QAERGSYSLG IFGGKAQEVA
 GSAEVKTVNG IRHIGLAAKQ

GI 7227388:

MFKRSVIAMA CIFALSACGG GGGGSPDVKS ADTLKPAAP VVSEKETEAK EDAPQAGSQG
 QGAPSAQGSQ DMAAVSEENT GNGGAVTADN PKNEDEVAQN DMPQNAAGTD SSTPNHTPDP
 NMLAGNMENQ ATDAGESSQP ANQPDMAAA DGMQGDPSA GGQNAAGNTAA QGANQAGNNQ
 AAGSSDPIPA SNPAPANGGS NFGRVDLANG VLIDGPSQNI TLTHCKGDSC SGNNFLDEEV
 QLKSEFEKLS DADKISNYKK DGKNDKRVGL VADSVQMKGI NQYIIFYKPK PTSFARFRRS
 ARSRRSLPAE MPLIPVNQAD TLIVDGEAVS LTGHSGNIFA PEGNYRYLTY GAEKLPGGSY
 ALRVQGEPAK GEMLAGAAVY NGEVLHFHTE NGRPYPTRGR FAAKVDFGSK SVDGIIDSGD
 DLHMGTQKFK AAIDGNGFKG TWTENGSGDV SGKFYGPAGE EVAGKYSYRP TDAEKGGFGV
 FAGKKEQD

GI 1518522:

MKKALATLIA LALPAAALAE GASGFYVQAD AAHAKASSSL GSAKGFSPRI SAGYRINDLR
 FAVDYTRYKN YKAPSTDEKL YSIGASAIYD FDTQSPVKPY LGARLSLNRA SVDLGGSDSF
 SQTSIGLGLV TGVSIAVTPN VDL DAGYRYN YIGKVNTVKN VRSGELSVGV RVKF