

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 692**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/22** (2006.01)

**A61K 39/095** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2003** **E 03757819 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014** **EP 1532168**

54 Título: **Procedimiento de replegamiento de proteína NSPA de Neisseria**

30 Prioridad:

**30.08.2002 GB 0220197**

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

**10.10.2014**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)**  
**rue de l'Institut 89**  
**1330 Rixensart, BE y**  
**UTRECHT UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BIEMANS, RALPH;**  
**BOS, MARTINE;**  
**DENOEL, PHILIPPE;**  
**FERON, CHRISTIANE;**  
**GORAJ, CARINE;**  
**POOLMAN, JAN;**  
**TOMMASSEN, JAN y**  
**WEYNANTS, VINCENT**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 505 692 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

Procedimiento de replegamiento de proteína NSPA de Neisseria

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de replegamiento de la proteína NspA (una proteína de la membrana externa de los organismos *Neisseria meningitidis*), y la divulgación se refiere a dichas proteínas replegadas, a composiciones farmacéuticas que las comprenden, y a su uso en el tratamiento, prevención y diagnóstico de infecciones bacterianas, tales como infecciones por *Neisseria* y, particularmente, pero no exclusivamente, *Neisseria meningitidis* y/o *Neisseria gonorrhoeae*.

**Antecedentes de la invención**

10 Las cepas de bacterias *Neisseria* son los agentes causantes de una serie de patologías humanas, contra las cuales hay una necesidad de desarrollo de vacunas eficaces. En particular, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* causan patologías que podrían ser tratadas mediante vacunación.

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

20 El alto número de cepas gonocócicas con resistencia a antibióticos contribuye a un aumento de la morbilidad y a complicaciones asociadas con la gonorrea. Una alternativa atractiva al tratamiento de la gonorrea con antibióticos sería su prevención usando vacunación. En la actualidad, no existe ninguna vacuna para infecciones de *N. gonorrhoeae*.

25 *Neisseria meningitidis* (meningococo) es una bacteria Gram-negativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. Ocasionalmente, causa enfermedades bacterianas invasivas, tales como bacteriemia y meningitis. La mayoría de los casos de la enfermedad se dan en bebés o niños pequeños. La incidencia de la enfermedad meningocócica muestra diferencias estacionales y anuales geográficas (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Suplemento), S18-S24, 1989). La mayor parte de la enfermedad en países de clima templado se debe a cepas del serogrupo B y su incidencia varía del 1-10/100.000 de población total al año, a veces alcanzando valores más altos (Kaczmarek, E.B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9,1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. et al. Clin. Infect. Dis. 16: 237-246,1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., et al. Epidemiol. Infect. 105: 119-126,1990).

30 Se encuentran epidemias dominadas por meningococos del serogrupo A, principalmente en África central, que a veces alcanzan niveles de hasta 1.000/100.000/año (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Suplemento), S18-S24, 1989). Casi todos los casos, en conjunto, de la enfermedad meningocócica son causados por meningococos de los serogrupos A, B, C, W-135 e Y, y hay disponible una vacuna de polisacárido tetravalente A, C, W-135 e Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339,1982).

35 La frecuencia de las infecciones por *Neisseria meningitidis* ha aumentado dramáticamente en las últimas décadas. Esto se ha atribuido a la aparición de múltiples cepas resistentes a antibióticos y una población creciente de personas con sistemas inmunológicos debilitados. Ya no es raro aislar cepas de *Neisseria meningitidis* que son resistentes a algunos o a todos los antibióticos estándar. Este fenómeno ha creado una necesidad médica no satisfecha y la demanda de nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de medicamentos y ensayos de diagnóstico para este organismo.

40 Martin D et al Journal of Biotechnology 83 (2000) 27-31 informa de que actualmente no existe ninguna vacuna eficaz que pueda estimular la inmunidad protectora común de grupo en los niños pequeños. Se están realizando esfuerzos para mejorar las vacunas de polisacáridos actuales mediante conjugación a proteínas portadoras o para encontrar otros antígenos de superficie meningocócica que podrían convertirse en la base de una vacuna de proteína. Sin embargo, la variabilidad entre cepas de las proteínas principales de membrana externa restringiría su eficacia protectora a un número limitado de cepas relacionadas antigénicamente. La proteína de superficie A de *Neisseria* (denominada en la presente memoria NspA) tiene características que indican que es un potencial candidato de vacuna para el desarrollo de una vacuna común de grupo contra la enfermedad meningocócica.

50 Se prevé que la NspA recombinante expresada en células podría ser producida para su uso en dichos nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de fármacos y ensayos de diagnóstico. Sin embargo, una de las principales limitaciones en la expresión de proteínas es la incapacidad de muchas proteínas recombinantes para

5 plegarse a sus conformaciones biológicamente activas. Frecuentemente, sólo se obtienen bajos rendimientos de la proteína recombinante debido a la agregación y al plegamiento incorrecto de las especies no plegadas. De hecho, el replegamiento de proteínas, en el que la proteína adquiere su estructura nativa y activa, es uno de los mayores desafíos en la biología molecular. Jansen et al. (Biochim. et Biophys. Acta. Biomembranes, 2000 1464:284-298) describe la caracterización de PorA de *Neisseria meningitidis* plegada in vitro.

10 Teniendo en cuenta los problemas asociados con la obtención de proteínas recombinantes replegadas, biológicamente activas, se ha previsto el uso de vectores no vivos, por ejemplo vesículas o "ampollas" bacterianas de membrana externa. Las ampollas OM se derivan de la membrana externa de la membrana de dos capas de bacterias Gram-negativas y se han documentado en muchas bacterias Gram negativas (Zhou, L et al. 1998. FEMS Microbiol. Lett. 163: 223-228). Sin embargo, las ampollas tienen la desventaja de que pueden expresar proteínas de la membrana externa que no son relevantes (por ejemplo, antígenos no protectores o proteínas inmunodominantes pero variables) o perjudiciales (por ejemplo, moléculas tóxicas tales como LPS, o inductores potenciales de una respuesta autoinmune). Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar una vacuna de subunidades contra la enfermedad por *Neisseria* que comprenda proteínas de membrana externa protectoras purificadas en una conformación replegada adecuada para provocar una respuesta inmune efectiva.

### Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para el replegamiento de la proteína NspA. Los presentes inventores han demostrado ahora que es posible aumentar la recuperación de proteína activa a partir de cuerpos de inclusión parcialmente purificados en cantidades de hasta el 100%, sin la necesidad de purificación adicional.

La presente divulgación se refiere a la proteína NspA replegada y a procedimientos para el uso de dichas proteínas, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades microbianas, entre otras, por ejemplo, en vacunas de subunidades. En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades asociadas con infecciones microbianas y afecciones asociadas con dichas infecciones.

### 25 Declaraciones de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de replegamiento de la proteína NspA que comprende poner en contacto la proteína NspA con un tampón de replegamiento alcalino que comprende 3-dimetildodecilamoniopropanosulfonato (en adelante, en la presente memoria, denominado también SB-12).

Preferentemente, el tampón de replegamiento comprende etanolamina y SB-12.

30 Preferentemente, el tampón de replegamiento tiene pH 11.

Preferentemente, el SB-12 es SB-12 al 0,2-1% o 0,3-0,8%.

Preferentemente, el SB-12 es SB-12 al 0,2%.

En otra realización preferente, el SB-12 es SB-12 al 0,5%.

En otra realización preferente, el SB-12 es SB-12 al 1%.

35 Preferentemente, el SB-12 está purificado.

Preferentemente, el SB-12 es purificado pasándolo por una columna de  $Al_2O_3$ .

Preferentemente, la etanolamina es etanolamina de aproximadamente 20 mM (más preferentemente de aproximadamente pH 11).

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

40 expresar NspA en una célula huésped;

romper la célula huésped para obtener un cuerpo de inclusión que comprende NspA;

lavar el cuerpo de inclusión;

solubilizar la NspA y/o el cuerpo de inclusión;

poner en contacto la NspA solubilizada con el tampón de replegamiento de la invención; y

45 retirar el tampón de replegamiento de la NspA.

Según otro aspecto de la divulgación, se proporciona un tampón de replegamiento que comprende etanolamina y SB-12 (por ejemplo, en las concentraciones indicadas anteriormente) para su uso en el procedimiento de la presente invención.

5 Según un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una proteína NspA aislada replegada, obtenida u obtenible mediante el procedimiento de la presente invención.

Según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína NspA replegada aislada de la presente divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, al menos el 30%, 50%, 70% o 90% de la proteína NspA presente en la composición de la divulgación esta replegada.

10 En una realización de la divulgación, la composición farmacéutica está en forma de una vacuna.

Preferentemente, dicha composición comprende al menos otro antígeno de Neisseria.

15 Preferentemente, dicha composición comprende además al menos una adhesina de Neisseria adicional, u otra proteína de membrana externa de Neisseria, o al menos un autotransportador de Neisseria, o al menos una toxina de Neisseria, o al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria. Más preferentemente, además de la NspA replegada aislada, hay presente al menos un autotransportador de Neisseria y al menos una toxina de Neisseria, o hay presente al menos un autotransportador de Neisseria y una proteína de adquisición de Fe de Neisseria, o hay presente al menos una toxina de Neisseria y al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria, o hay presente al menos un autotransportador de Neisseria y al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria y hay presente al menos una toxina de Neisseria, o sus fragmentos inmunogénicos.

20 Más preferentemente, la composición farmacéutica de la divulgación comprende al menos un antígeno adicional (o fragmento del mismo) seleccionado de entre al menos una de las clases siguientes:

al menos una adhesina de Neisseria seleccionada de entre el grupo que consiste en FhaB, Hsf, NadA, PilC, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995 y NMB1119;

25 al menos un autotransportador de Neisseria seleccionado de entre el grupo que consiste en Hsf, Hap, proteasa IgA, AspA y NadA;

al menos una toxina de Neisseria seleccionada de entre el grupo que consiste en FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT y cualquiera o ambos de entre el inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS;

30 al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria seleccionada de entre el grupo que consiste en TbpA alta, TbpA baja, TbpB alta, TbpB baja, LbpA, LbpB, P2086, HpuA, HpuB, Lipo28, Sibp, FbpA, BfrA, BfrB, Bcp, NMB0964 y NMB0293; y

al menos una proteína asociada con la membrana de Neisseria, preferentemente una proteína de la membrana externa, seleccionada de entre el grupo que consiste en PldA, TspA, FhaC, NspA, TbpA (alta), TbpA (baja), LbpA, HpuB, TdfH, PorB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, MitA, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, TspB, PilQ y OMP85.

35 Más preferentemente, la composición farmacéutica de la divulgación comprende al menos un antígeno adicional (o fragmento del mismo) seleccionado de entre al menos una de las clases siguientes:

al menos una adhesina de Neisseria seleccionada de entre el grupo que consiste en FhaB, Hsf y NadA;

al menos un autotransportador de Neisseria seleccionado de entre el grupo que consiste en Hsf, Hap y;

40 al menos una toxina de Neisseria seleccionada de entre el grupo que consiste en FrpA, FrpC, y cualquiera o ambos de entre el inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS;

al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria seleccionada de entre el grupo que consiste en TbpA, TbpB, LbpA y LbpB; y

al menos una proteína de membrana externa de Neisseria (o fragmento de la misma) seleccionada de entre el grupo que consiste en PldA, TspA, TspB, PilQ y OMP85.

45 Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende un antígeno adicional derivado de *Neisseria meningitidis*.

Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende un antígeno adicional derivado de

*Neisseria gonorrhoeae*.

5 Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente divulgación es, al menos en parte, una preparación de subunidades. Aunque puede ser una preparación de subunidades mezclada con una preparación de ampolla que comprende antígenos de *Neisseria* adicionales de la divulgación (preferentemente sobreexpresados), también es preferente que las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación sean en su totalidad una preparación de subunidades con cualquier antígeno de *Neisseria* adicional de la divulgación presente en una forma replegada, o como un fragmento soluble expuesto en la superficie del antígeno de *Neisseria* adicional.

Preferentemente, la composición farmacéutica de la divulgación comprende además polisacáridos u oligosacáridos capsulares.

10 Preferentemente, dichos polisacáridos u oligosacáridos capsulares se derivan de bacterias seleccionadas de entre el grupo que consiste en los serogrupos A, C, Y y/o W-135 de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae b*, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos del grupo A, estreptococos del grupo B, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y, más preferentemente, se conjugan a una fuente de epítomos de linfocitos T.

15 Según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo inmuno específico para la proteína NspA de la presente divulgación.

20 Según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para diagnosticar una infección por *Neisseria*, que comprende identificar una proteína NspA de la presente divulgación, o un anticuerpo que es inmuno específico para dicha proteína, presente dentro de una muestra biológica de un animal, incluyendo un ser humano, sospechoso de tener dicha una infección, o usar una proteína de NspA o anticuerpo de la presente invención para detectar si hay presentes o no NspA o anticuerpos contra NspA dentro de una muestra biológica de un animal.

Preferentemente, el procedimiento se refiere al diagnóstico de *Neisseria meningitidis* y, más preferentemente, al serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

En otra realización preferente de la divulgación, el procedimiento se refiere al diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae*.

25 Según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona el uso de una composición que comprende una proteína NspA de la presente invención en la preparación de un medicamento para su uso en la generación de una respuesta inmune en un animal.

En una realización de la divulgación, la vacuna se usa en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por *Neisseria*.

30 En una realización preferente de la divulgación, se usa en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por *Neisseria meningitidis* y, más preferentemente, por el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

En otra realización preferente de la divulgación, se usa en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

35 Según todavía otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica útil en el tratamiento de seres humanos con una enfermedad por *Neisseria* que comprende al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína NspA de la presente divulgación y un vehículo farmacéutico adecuado.

Según un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona el uso del anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad por *Neisseria*.

40 Según una realización preferente de la divulgación, se previene o se trata una infección por *Neisseria meningitidis* y, más preferentemente, una infección por serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

Según otra realización preferente de la divulgación, se previene o se trata una infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

### Descripción detallada

Ahora, se describirán diversas características y realizaciones preferentes de la presente invención, a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

45 La Figura 1 muestra un gel de SDS-PAGE que compara una NspA replegada según el procedimiento de la presente invención y una NspA desnaturalizada. Más detalladamente, la Figura 1 muestra la modificabilidad por calor de la NspA replegada purificada en PAGE al 14% teñido con azul Coomassie. n = desplazamiento de la NspA replegada purificada en condiciones semi-nativas, y d = desplazamiento de la NspA replegada purificada en condiciones de

desnaturalización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la derecha.

La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la NspA H44/76 usada en los Ejemplos; y

La Figura 3 muestra los nucleótidos y los aminoácidos de NspA, incluyendo la secuencia líder.

5 Aunque, en general, las técnicas indicadas en la presente memoria son bien conocidas en la materia, puede hacerse referencia particular a Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989) y Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc (así como la versión completa de *Current Protocols in Molecular Biology*).

10 Los presentes inventores pretenden que las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende", en la presente memoria, puedan ser sustituidas opcionalmente por las expresiones "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en todos los casos.

#### Procedimiento

La presente invención proporciona un procedimiento para promover el plegamiento/replegamiento correcto de una proteína NspA, cuyo procedimiento implica el uso del detergente SB-12 en un tampón de replegamiento alcalino.

15 Típicamente, el procedimiento de la presente invención se usa para ayudar a replegar la NspA producida de manera recombinante que se obtiene en una forma no plegada o plegada de manera incorrecta. De esta manera, las proteínas producidas de manera recombinante pueden ponerse en contacto con el tampón de replegamiento para desplegar, replegar y/o reactivar proteínas recombinantes que son inactivas debido al plegamiento incorrecto y/o se despliegan como resultado de su extracción desde las células huésped en las que se expresaron (tal como a partir de cuerpos de inclusión bacterianos). Dicho procedimiento puede denominarse también "reacondicionamiento".

20 El procedimiento de la invención puede emplearse para mantener la conformación plegada de NspA, por ejemplo durante el almacenamiento, con el fin de aumentar la vida útil. Bajo las condiciones de almacenamiento, muchas proteínas pierden su actividad, como resultado de la interrupción del plegamiento correcto. La presencia del tampón de replegamiento de la presente invención reduce o invierte la tendencia de proteínas a pasar a un estado no plegamiento y, de esta manera, aumenta considerablemente su vida útil.

25 El procedimiento de la invención puede usarse para promover el plegamiento correcto de NspA que, durante el almacenamiento, exposición a condiciones desnaturalizantes, etc., se ha plegado incorrectamente. De esta manera, la invención puede ser usada para reacondicionar la NspA. Por ejemplo, la NspA con una necesidad de reacondicionamiento puede ponerse en contacto con el tampón de replegamiento según la invención.

30 La presente invención proporciona también un procedimiento para alterar la estructura de una proteína NspA. Las alteraciones estructurales incluyen plegamiento, desplegamiento y replegamiento. Preferentemente, el efecto de las alteraciones es el de mejorar el rendimiento, la actividad específica y/o la calidad de la molécula. Típicamente, esto puede conseguirse volviendo a solubilizar, acondicionar y/o reactivar las moléculas plegadas incorrectamente después de la síntesis.

35 De esta manera, los términos "reacondicionamiento" y "reactivación" abarcan procedimientos *in vitro*. Los ejemplos particulares de procedimientos *in vitro* pueden incluir el procesamiento de proteínas que han sido solubilizadas a partir de extractos de células (tales como cuerpos de inclusión) usando fuertes desnaturalizantes, tales como urea o cloruro de guanidinio.

40 Los términos "replegar", "reactivar" y "reacondicionar" no pretenden ser mutuamente excluyentes. Por ejemplo, una proteína inactiva, quizás desnaturalizada usando urea, puede tener una estructura no plegada. Esta proteína inactiva puede ser replegada entonces con un tampón de replegamiento de la invención, reactivándola de esta manera. En algunas circunstancias, puede haber un aumento en la actividad específica de la proteína replegada/reactivada en comparación con la proteína antes de la inactivación/desnaturalización: esto se denomina "reacondicionamiento".

Típicamente, la molécula es una proteína no plegada o plegada incorrectamente que tiene necesidad de plegamiento. De manera alternativa, sin embargo, puede ser una proteína plegada que debe mantenerse en un estado plegado.

45 La invención prevé al menos dos situaciones. Una primera situación es una en la que la proteína a ser plegada está en un estado no plegado o plegado incorrectamente, o ambos. En este caso, su plegamiento correcto se promueve mediante el procedimiento de la invención. Una segunda situación es una en la que la proteína ya está sustancialmente en su estado plegado correctamente, es decir la totalidad o la mayor parte de la misma está plegada correctamente o casi correctamente. En este caso, el procedimiento de la invención sirve para mantener el estado plegado de la proteína, afectando al equilibrio plegado/desplegado de manera que se favorece el estado plegado. Esto previene la pérdida de actividad de una proteína ya plegada de manera sustancialmente correcta. Estas y otras eventualidades

50

están cubiertas por la referencia a "promover" el plegamiento de la proteína.

Tal como se usa en la presente memoria, una proteína puede estar no plegada cuando al menos parte de la misma no ha adquirido todavía su estructura secundaria o terciaria correcta o deseada. Una proteína está plegada incorrectamente cuando ha adquirido, al menos parcialmente, una estructura secundaria o terciaria incorrecta o no deseada. Se conocen técnicas en la materia para evaluar la estructura de las proteínas (tales como dicroísmo circular).

El tampón de replegamiento de la presente invención comprende 3-dimetildodecilamoniopropanosulfonato (denominado también N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato) y denominado en la presente memoria "SB-12". El SB-12 está disponible a partir de fuentes comerciales, tales como Fluka AG. Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría, los presentes inventores creen que la etapa de dilución en SB-12 (o la presencia de SB-12, en general) crea un entorno hidrófobo para la proteína, que es similar al entorno natural *in vivo* de la proteína.

El SB-12 es un detergente y la concentración de SB-12 debería ser de al menos aproximadamente el 0,2% (p/v), ya que esta es la concentración requerida generalmente para la formación de micelas. De esta manera, la concentración de SB-12 puede ser de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 5,0%, de aproximadamente el 0,3% a aproximadamente el 4,0%, de aproximadamente el 0,4% a aproximadamente el 3,0%, o de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2,0%. Preferentemente, la concentración es de aproximadamente el 0,2%, el 0,3%, el 0,4%, el 0,5%, el 0,6%, el 0,7%, el 0,8%, el 0,9% o el 1,0%. En una realización especialmente preferente, se usa el 0,5% de SB-12. El término "aproximadamente" significa, preferentemente, +/- 10% del valor de la cifra indicada pero, más preferentemente, es la cifra exacta indicada.

En una realización preferente, el SB-12 se purifica. Los presentes inventores han encontrado un mejor plegamiento con SB-12 purificado en comparación con SB-12 no purificado. De manera conveniente, el SB-12 puede purificarse antes de su uso pasando una solución concentrada de SB-12 sobre una columna de cromatografía con  $Al_2O_3$ , por ejemplo, usando metanol/cloroformo (1:1), pero puede usarse cualquier procedimiento adecuado para purificar el SB-12.

Los presentes inventores han encontrado que la dilución de la proteína desnaturalizada debería llevarse a cabo en un entorno alcalino para maximizar la eficiencia del replegamiento. Preferentemente, el pH del tampón de replegamiento es de aproximadamente 11,0. Preferentemente, el entorno alcalino se obtiene mediante el uso de etanolamina. En esta realización preferente, el tampón de replegamiento comprende SB-12 y etanolamina. De manera conveniente, se usa etanolamina 20 mM, pero otras concentraciones, tales como 50 mM, pueden ser útiles.

Los presentes inventores han encontrado que es preferente una dilución 1:20 de la NspA en el tampón de replegamiento, pero pueden usarse otras relaciones, tales como 1:10. También puede usarse una dilución de cinco veces en tampón de replegamiento.

Típicamente, la NspA a ser procesada por el procedimiento de la invención se obtiene a partir de extractos celulares de células huésped que expresan la NspA recombinante. Las células huésped incluyen procariontas tales como *E. coli*, levadura y células de insectos (el sistema de baculovirus es capaz de una expresión de proteínas de muy alto nivel). Preferentemente, la expresión de la NspA en la célula huésped es a altos niveles para maximizar el rendimiento. A continuación, se proporcionan detalles adicionales sobre la expresión de NspA recombinante.

Los presentes inventores han encontrado que la presente invención es más eficiente cuando se usa para replegar una proteína NspA madura, es decir, una proteína sin una secuencia líder o secretora, una secuencia pre-, pro- o preproteínas, y también una proteína. Típicamente, para NspA, esto significa expresar la proteína sin el péptido señal (aminoácidos 1-19). Durante las técnicas de purificación convencionales, es común hacer uso de una secuencia marcadora que facilita la purificación, tal como un péptido de hexa-histidina, tal como se proporciona en el vector pQE (Qiagen, Inc.) y se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 86: 821-824 (1989), o un marcador de péptido HA (Wilson et al, Cell 37: 767 (1984)). Los presentes inventores han encontrado que el procedimiento de la presente invención es más eficiente cuando dichas secuencias marcadoras no estén presentes.

Es probable que una proporción sustancial de la NspA será insoluble y, por consiguiente, típicamente se emplearán técnicas para solubilizar componentes normalmente insolubles de los extractos de células (tales como cuerpos de inclusión) para maximizar la extracción de la NspA. Puede emplearse cualquier técnica convencional para la preparación y la extracción de las proteínas NspA a partir de cuerpos de inclusión y su posterior solubilización. Dichas técnicas se describen por ejemplo en "Current Protocols in Protein Science" publicado por JA Wiley & Sons. Dichas técnicas incluyen generalmente:

Lisis celular, usando, por ejemplo, una prensa francesa o ultrasonidos, para liberar los cuerpos de inclusión. Típicamente, las células se colocan en un tampón frío, tal como un tampón TE antes de la lisis. Los ultrasonidos pueden aplicarse usando un sonicador Branson. La sonicación puede tener lugar en presencia de un detergente, por ejemplo, Brij o Triton. A continuación, los cuerpos de inclusión en el lisado celular pueden ser sedimentados usando centrifugación a baja velocidad. Las células pueden ser tratadas previamente con lisozima antes de la

lisis. El propósito del pretratamiento es el de ayudar a la eliminación de los peptidoglicanos y los contaminantes de proteínas de membrana externa durante las etapas de lavado. Las células lisadas pueden ser clarificadas mediante centrifugación y el sobrenadante puede ser desechado.

5 Lavado del cuerpo de inclusión, para eliminar la pared celular y otros contaminantes componentes de la membrana externa de los cuerpos de inclusión recuperados a partir de lisados celulares. Típicamente, el sedimento se vuelve a suspender en un tampón de lavado que contiene, por ejemplo, tampón tal como tampón TE y/o un detergente, tal como Triton. A continuación, la suspensión puede volver a suspenderse y el sobrenadante se desecha. Este procedimiento puede repetirse hasta que el sobrenadante es transparente. Si se requiere, los sedimentos lavados pueden congelarse para el almacenamiento.

10 La cantidad de proteína recombinante en el sedimento lavado puede estimarse usando las directrices siguientes: (1) Un nivel de expresión del 1% corresponde a ~ 1 mg de proteína recombinante por 1 g de células húmedas. (2) La recuperación de proteína recombinante altamente agregada en los sedimentos lavados es del ~75% de la cantidad presente originalmente en las células. (3) Aproximadamente el 60% de la proteína sedimentada total lavada es derivada de manera recombinante. La cantidad total de proteína recombinante puede determinarse directamente  
15 midiendo la concentración total de proteína o analizando los sedimentos lavados mediante SDS-PAGE para determinar las proporciones de los constituyentes de proteína.

20 Solubilización de la proteína. A continuación la proteína se extrae del sedimento lavado y es desplegada usando un desnaturante que disocia interacciones proteína-proteína y despliega la proteína de manera que consiste en monómeros desplegados. Los desnaturantes incluyen guanidina:HCl (tal como guanidina:HCl 6 M) y/o urea (tal como urea 8 M). Típicamente, el material y los materiales insolubles residuales pueden eliminarse mediante ultracentrifugación (por ejemplo 100.000 g x durante 1 hora). El extracto puede ser almacenado por congelación después de la sedimentación.

25 Opcionalmente, los extractos de células solubilizadas pueden purificarse parcialmente, por ejemplo, mediante una diversidad de técnicas de cromatografía de afinidad antes de contactar con el tampón de replegamiento según el procedimiento de la invención.

A continuación, el extracto de células solubilizadas se diluye en el tampón de replegamiento según la presente invención. Es típico, pero no necesario, dejarlo bajo agitación a temperatura ambiente durante la noche.

30 De esta manera, el material de partida para el procedimiento de replegamiento/reacondicionamiento de la invención es, típicamente, proteínas desnaturadas en soluciones de agentes tales como cloruro de urea/guanidinio. De manera alternativa, o adicional, las muestras de proteínas solubles pueden desnaturarse específicamente mediante la adición de agentes desnaturantes apropiados antes del replegamiento.

35 El procedimiento de la invención puede emplear también el uso de chaperonas moleculares. Las chaperonas, incluyendo las chaperoninas, son proteínas que promueven el replegamiento de proteínas mediante medios no enzimáticos, en el sentido de que no catalizan la modificación química de ninguna estructura en el replegamiento de las proteínas, sino que promueven el replegamiento correcto de las proteínas facilitando el alineamiento estructural correcto de las mismas. Las chaperonas moleculares son bien conocidas en la técnica, caracterizándose diversas familias de las mismas. La invención puede emplear cualquier molécula chaperona molecular, cuyo término incluye, por ejemplo, las chaperonas moleculares seleccionadas de entre el siguiente grupo no exhaustivo:

40 p90 Calnexin, familia HSP, familia HSP70, DNA K, DNAJ, familia Hsp60 (GroEL), chaperonas asociadas a ER, HSP90, Hsc70, sHsps; SecA; SecB, factor desencadenante, hsp 47, 70 y 90 de pez cebra, HSP 47, GRP 94, Cpn 10, BiP, GRP 78, C1p, FtsH, cadena invariante Ig, hsp70 mitocondrial, EBP, m-AAA mitocondrial, levadura Ydj1, Hsp104, ApoE, Syc, Hip, familia TriC, CCT, PapD y calmodulina (véase el documento W099/05163 para las referencias).

45 El procedimiento de la presente invención puede hacer uso también de un foldasa. En términos generales, una foldasa es una enzima que participa en la promoción del replegamiento de proteínas mediante su actividad enzimática para catalizar la reordenación o isomerización de enlaces en el replegamiento de la proteína. De esta manera, son distintas de una chaperona molecular, que se une a proteínas en estados estructurales inestables o no nativos y promueven un replegamiento correcto sin catálisis enzimática de reordenación de enlaces. Se conocen muchas clases de foldasa, y son comunes a animales, plantas y bacterias. Incluyen peptidil prolil isomerasas y tiol/disulfuro oxidorreductasas. La  
50 invención puede emplear cualquiera de las foldasas que son capaces de promover el replegamiento de proteínas a través de reordenación de enlaces covalentes.

Al final del procedimiento de replegamiento/reacondicionamiento, la NspA replegada puede ser desalada mediante diálisis contra un tampón de almacenamiento adecuado y/o usando una columna de desalación en un tampón de almacenamiento adecuado. Los tampones adecuados incluyen fosfato de sodio 25 mM, NaCl 150 mM y 0,1% de PEG

6000 (pH 7,4).

Vectores, células huésped, sistemas de expresión

5 La invención puede emplear vectores que comprenden un polinucleótido que codifica para al menos una proteína NspA, células huésped que están modificadas mediante ingeniería genética con vectores de la invención y la producción de proteínas NspA mediante técnicas recombinantes. También pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir dichas proteínas usando ARN derivados de constructos de ADN.

Las proteínas recombinantes de la presente divulgación pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos por las personas con conocimientos en la materia a partir de células huésped manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión.

10 Para la producción recombinante de las proteínas de la divulgación, las células huésped pueden ser manipuladas genéticamente para incorporar sistemas de expresión o partes de los mismos o polinucleótidos de la divulgación. La introducción de un polinucleótido en la célula huésped puede efectuarse mediante procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis, et al, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook, et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), tal como, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga de raspaduras, introducción balística e infección.

15 Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de estreptococos, estafilococos, enterococos, *E. coli*, *Streptomyces*, cianobacterias, *Bacillus subtilis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*; células fúngicas, tales como células de una levadura, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, un basidiomiceto, *Candida albicans* y *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 y células de melanoma de Bowes; y células de plantas, tales como células de una gimnosperma o angiosperma.

20 Puede usarse una gran diversidad de sistemas de expresión para producir las proteínas de la divulgación. Dichos vectores incluyen, entre otros, vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tales como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de pseudorrabia, picornavirus, retrovirus, y alfavirus y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de plásmidos y elementos genéticos de bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los constructos del sistema de expresión pueden contener regiones de control que regulan y generan la expresión. Generalmente, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o para expresar una proteína en un huésped puede ser usado para la expresión en este sentido. La secuencia de ADN apropiada puede ser insertada en el sistema de expresión mediante cualquiera de entre una diversidad de técnicas bien conocidas y rutinarias, tales como, por ejemplo, aquellas expuestas en Sambrook et al., MOLECULE CLONING, A LABORATORY MANUAL, (supra).

25 En los sistemas de expresión recombinantes en eucariotas, para la secreción de una proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en la proteína expresada. Estas señales pueden ser endógenas a la proteína o pueden ser señales heterólogas.

40 Las proteínas de la presente divulgación pueden ser recuperadas y purificadas a partir de cultivos de células recombinantes mediante el procedimiento de la presente invención.

Proteína NspA

45 La presente invención proporciona una proteína NspA replegada aislada. Tal como se usa en la presente memoria, el término "proteína" incluye el término "polipéptido". El término "aislado" pretende indicar que la proteína NspA está libre de otras proteínas con las que está asociada normalmente. La proteína NspA puede ser una proteína recombinante. El término "recombinante" pretende indicar que la proteína ha sido obtenida usando la aplicación de biología molecular. Sin embargo, el procedimiento es aplicable también a proteínas naturales o sintéticas que requieren replegamiento o purificación por medio de desplegamiento y replegamiento. Preferentemente, la NspA replegada aislada de la divulgación está purificada en el sentido de que tiene una pureza superior al 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99%. Más preferentemente, la NspA de la divulgación es biológicamente pura en el sentido de que es más del 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99% libre de otras proteínas de *Neisseria* y/u otras proteínas de la célula huésped a partir de la que se creó.

50 Cuando en la presente memoria se indica específicamente una proteína, es preferentemente una referencia a una proteína nativa, de longitud completa, pero puede englobar también fragmentos antigénicos de la misma (particularmente en el contexto de vacunas de subunidades). Estos son fragmentos que contienen o comprenden al

5 menos 10 aminoácidos, preferentemente 20 aminoácidos, más preferentemente 30 aminoácidos, más preferentemente 40 aminoácidos o más preferentemente 50 aminoácidos, tomados contiguamente a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, los fragmentos antigénicos denotan fragmentos que son inmunológicamente reactivos con anticuerpos generados contra las proteínas de *Neisseria* o con anticuerpos generados por infección de un huésped mamífero con *Neisseria*. Los fragmentos antigénicos incluyen también fragmentos que, cuando se administran en una dosis eficaz, provocan una respuesta inmune protectora contra la infección por *Neisseria*, más preferentemente, protectora contra una infección por *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae*, más preferentemente, protectora contra una infección por serogrupo B de *N. meningitidis*.

10 La presente divulgación incluye también variantes de las proteínas indicadas en la presente memoria, es decir, proteínas que varían con respecto a los referentes en sustituciones conservadoras de aminoácidos, de manera que un residuo es sustituido por otro con características similares. Dichas sustituciones típicas son entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lys y Arg; o residuos aromáticos Phe y Tyr. Son particularmente preferentes las variantes en las que diversos, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 ó 1 aminoácidos son sustituidos, eliminados o añadidos en cualquier combinación.

15 Se ha informado de que la proteína NspA altamente conservada ha sido encontrada en la membrana externa de cada cepa de *Neisseria meningitidis* ensayada hasta ahora (Martin D et al Journal of Biotechnology 83 (2000) 27-31). Martin D et al muestran también que la proteína NspA está expuesta en la superficie de las cepas meningocócicas intactas. La proteína NspA ha sido identificada también en *Neisseria gonorrhoeae* (Plante et al Infect, Immun. 67 (1999) 2855-2861). El gen nspA meningocócico puede ser amplificado directamente mediante PCR a partir de ADN cromosómico (Martin D et al y Plante et al 1999 supra). NspA se describe también en el documento W096/29412.

20 La NspA producida por la presente invención, fragmento o variante de la misma, preferentemente es un producto que exhibe la actividad inmunológica de la proteína NspA de tipo salvaje (por ejemplo, tal como está presente en ampollas de *Neisseria* aisladas). Preferentemente, mostrará al menos uno de las siguientes:

25 Una capacidad para inducir la producción de anticuerpos que reconocen la NspA de tipo salvaje (si es necesario, cuando la proteína NspA de la presente invención se acopla a un vehículo);

Una capacidad para inducir la producción de anticuerpos que pueden proteger contra la infección experimental; y

Una capacidad para inducir, cuando se administra a un animal, el desarrollo de una respuesta inmunológica que puede proteger contra una infección por *Neisseria*, tal como infección por *Neisseria meningitidis* y/o *Neisseria gonorrhoeae*.

30 La proteína NspA de la presente divulgación es útil en composiciones profilácticas, terapéuticas y de diagnóstico para la prevención, el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades causadas por *Neisseria*, particularmente *Neisseria meningitidis*; aunque también puede tener aplicaciones similares en relación, por ejemplo, a *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria lactamica*.

35 Pueden emplearse técnicas inmunológicas estándar con la proteína NspA de la presente divulgación con el fin de usarla como un inmunógeno y en una vacuna. En particular, cualquier huésped adecuado puede ser inyectado con una cantidad farmacéuticamente eficaz de la proteína NspA para generar anticuerpos monoclonales o policlonales anti-NspA o para inducir el desarrollo de una respuesta inmunológica protectora contra una enfermedad por *Neisseria*. Antes de la administración, la proteína NspA puede ser formulada en un vehículo adecuado y, de esta manera, proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una o más proteínas de la presente invención. Tal como se usa en la presente memoria, "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de proteína NspA que provoca una titulación suficiente de anticuerpos para tratar o prevenir la infección. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender también otros antígenos útiles en el tratamiento o la prevención de la enfermedad.

40 La proteína NspA de esta divulgación puede formar también la base de un ensayo de diagnóstico para la infección. Por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento para la detección de un antígeno de *Neisseria* en una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene el antígeno de *Neisseria* que comprende:

generar un anticuerpo anti-NspA usando la proteína de la presente divulgación;

aislar la muestra biológica a partir de un paciente;

45 50 incubar el anticuerpo anti-NspA o un fragmento del mismo con la muestra biológica; y detectar el anticuerpo unido o el fragmento unido.

La presente divulgación proporciona también un procedimiento para la detección de un anticuerpo específico a la proteína NspA en una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene dicho anticuerpo que

comprende:

aislar la muestra biológica a partir de un paciente;

incubar la proteína NspA de la divulgación con la muestra biológica; y detectar el antígeno unido.

Este ensayo de diagnóstico puede adoptar diversas formas, incluyendo ELISA y un radioinmunoensayo.

5 A continuación, se proporcionan detalles adicionales de dichas aplicaciones.

Anticuerpos

Las proteínas de la divulgación pueden ser usadas como inmunógenos para producir anticuerpos inmunespecíficos para dichas proteínas.

10 En ciertas realizaciones preferentes de la divulgación se proporcionan anticuerpos contra la proteína NspA de la divulgación.

15 Los anticuerpos generados contra las proteínas de la divulgación pueden obtenerse administrando las proteínas de la divulgación, o fragmentos que transportan epítomos de cualquiera o ambos, análogos de cualquiera o ambos, a un animal, preferentemente no humano, usando protocolos de rutina. Para la preparación de los anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica conocida en la materia que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Los ejemplos incluyen diversas técnicas, tales como las descritas en Kohler, G. y Milstein, C., Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor et al, Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., Pg. 77-96 en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. (1985).

20 Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente US Nº 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla para proteínas de esta divulgación. Además, pueden usarse ratones transgénicos u otros organismos o animales, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados inmunespecíficos a las proteínas de la divulgación.

25 De manera alternativa, puede utilizarse la tecnología de presentación en fagos para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión hacia una proteína de la divulgación ya sea a partir de repertorios de genes v amplificados mediante PCR de linfocitos de seres humanos seleccionados por poseer anti-NspA o a partir de bibliotecas vírgenes o "naive" (McCafferty, et al., (1990), Nature 348,552-554;. Marks, et al, (1992) Biotechnology 10, 779-783). La afinidad de estos anticuerpos puede ser mejora también, por ejemplo, mediante una mezcla aleatoria de cadenas (Clackson et al, (1991) Nature 352: 628).

Los anticuerpos descritos anteriormente pueden emplearse para aislar o identificar clones que expresan las proteínas NspA de la divulgación para purificar las proteínas o polinucleótidos, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

30 De esta manera, entre otros, los anticuerpos contra la proteína NspA de la divulgación pueden emplearse para tratar infecciones, particularmente infecciones bacterianas.

35 Preferentemente, el anticuerpo o variante del mismo se modifica para hacerlo menos inmunogénico en el individuo. Por ejemplo, si el individuo es un ser humano, más preferentemente, el anticuerpo puede ser "humanizado", donde la región o regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de hibridoma ha sido trasplantado a un anticuerpo monoclonal humano, por ejemplo, tal como se describe en Jones et al. (1986), Nature 321,522-525 o Tempest et al., (1991) Biotechnology 9, 266-273.

40 Una proteína de la presente divulgación puede ser administrada a un receptor que entonces actúa como una fuente de inmunoglobulina, producida en respuesta a un desafío a partir de la vacuna específica. Un sujeto tratado de esta manera donaría plasma a partir del cual se obtendría globulina hiperinmune a través de la metodología de fraccionamiento de plasma convencional. La globulina hiperinmune sería administrada a otro sujeto con el fin de conferir resistencia contra, o tratar una infección por, Neisseria. Las globulinas hiperinmunes de la divulgación son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad por Neisseria en bebés, individuos inmunodeprimidos o cuando se requiera tratamiento y no hay tiempo para que el individuo produzca anticuerpos en respuesta a la vacunación.

45 Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal (o fragmentos del mismo, preferentemente humanos o humanizados) reactivo contra la composición farmacéutica de la divulgación, que podría ser usada para tratar o prevenir la infección por bacterias Gram negativas, preferentemente Neisseria, más preferentemente *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* y más preferentemente el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

50 Dichas composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos monoclonales que pueden ser inmunoglobulinas

enteras de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad a dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos, por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv y similares, incluyendo fragmentos híbridos.

5 Los procedimientos de fabricación de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica y pueden incluir la fusión de esplenocitos con células de mieloma (Kohler y Milstein 1975 Nature 256; 495; Antibodies - a laboratory manual Harlow y Lane 1988). De manera alternativa, los fragmentos Fv monoclonales pueden obtenerse cribando una biblioteca de presentación en fago adecuada (Vaughan TJ et al 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Los anticuerpos monoclonales pueden ser humanizados o parcialmente humanizados mediante procedimientos conocidos.

#### Vacunas

10 Otro aspecto de la divulgación se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica en un individuo, particularmente un mamífero, preferentemente seres humanos, que comprende inocular al individuo con la proteína NspA de la presente divulgación, o un fragmento o variante de la misma, adecuada para producir anticuerpo y/o una respuesta inmune de los linfocitos T para proteger (o tratar) dicho individuo contra la infección, particularmente infección bacteriana y, más particularmente, infección por *Neisseria meningitidis*. También se proporcionan  
15 procedimientos mediante los cuales dicha respuesta inmunológica ralentiza la replicación bacteriana.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición inmunológica que, cuando es introducida en un individuo, preferentemente un ser humano, capaz de inducir en su interior una respuesta inmunológica, induce una respuesta inmunológica en dicho individuo a una proteína NspA de la presente divulgación, en la que el composición comprende una NspA recombinante de la divulgación. La respuesta inmunológica puede ser usada terapéutica o profilácticamente y puede adoptar la forma de inmunidad de anticuerpos y/o inmunidad celular, tal como inmunidad  
20 celular que surge de linfocitos T CTL o CD4+.

Una proteína NspA, una variante o un fragmento de la misma pueden fusionarse con co-proteína o fracción química que puede producir o no, por sí misma, anticuerpos, pero que es capaz de producir una proteína fusionada o modificada que tendrá propiedades antigénicas y/o inmunogénicas y, preferentemente, propiedades protectoras y,  
25 opcionalmente, puede estabilizar la NspA, o hacer que sea más fácil de purificar. La coproteína puede actuar como un adyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmune del organismo que recibe la proteína.

La presente divulgación proporciona también composiciones, particularmente composiciones de vacuna, y procedimientos que comprenden las proteínas de la invención y secuencias de ADN inmunoestimuladoras, tales como  
30 las descritas en Sato, Y. et al. Science 273: 352 (1996).

La divulgación incluye también una formulación de vacuna que comprende una proteína inmunogénica de la divulgación o un fragmento o una variante de la misma, junto con un vehículo adecuado, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable. Debido a que las proteínas pueden descomponerse en el estómago, cada una se administra preferentemente por vía parenteral, incluyendo, por ejemplo, una administración que es subcutánea,  
35 intramuscular, intravenosa o intradérmica. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con el fluido corporal, preferentemente la sangre, del individuo; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiples, por ejemplo,  
40 ampollas y viales sellados y pueden almacenarse en un estado liofilizado que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso. La formulación puede administrarse también por vía mucosa, por ejemplo, por vía intranasal.

La formulación de vacuna de la divulgación puede incluir también sistemas adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación. Típicamente, puede usarse fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.  
45 Preferentemente, el sistema adyuvante genera preferentemente una respuesta de tipo TH1.

Una respuesta inmune puede distinguirse ampliamente en dos categorías extremas, siendo respuestas inmunes humorales o mediadas por células (caracterizadas tradicionalmente por anticuerpos y mecanismos efectos celulares de protección, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo TH1 (respuesta mediada por células), y respuestas inmunes de tipo TH2 (respuesta humoral).

50 Las respuestas inmunes extremas de tipo TH1 pueden caracterizarse por la generación de linfocitos T citotóxicos restringidos por haplotipos, específicos de antígeno, y respuestas de células asesinas naturales. En ratones, las respuestas de tipo TH1 se caracterizan frecuentemente por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano éstas corresponden a anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunes de tipo TH2 se caracterizan por la generación de una amplia gama de isotipos de inmunoglobulina incluyendo en ratones IgG1, IgA, e

IgM.

Puede considerarse que la fuerza impulsora detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunes son las citoquinas. Los altos niveles de citoquinas de tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células al antígeno determinado, mientras que los altos niveles de citoquinas de tipo TH2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

La distinción entre respuestas inmunes de tipo TH1 y TH2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmune que se describe como predominantemente TH1 o predominantemente TH2. Sin embargo, frecuentemente es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo descrito en los clones de linfocitos T CD4+ve murinos por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo TH1 se asocian con la producción de las citoquinas INF- $\gamma$  e IL-2 por linfocitos T. Otras citoquinas frecuentemente asociadas directamente con la inducción de respuestas inmunes de tipo TH1 no son producidas por los linfocitos T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo TH2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

Se sabe que ciertos adyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de citoquinas de tipo TH1 o TH2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio TH1:TH2 de la respuesta inmune después de una vacunación o infección incluye la medición directa de la producción de citoquinas TH1 o TH2 por los linfocitos T *in vitro* después de una reestimulación con antígeno, y/o la medición de la relación IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpos específicos de antígeno.

De esta manera, un adyuvante de tipo TH1 es uno que estimula preferentemente poblaciones aisladas de linfocitos T para producir altos niveles de citoquinas de tipo TH1 cuando se re-estimulan con antígeno *in vitro*, y promueve el desarrollo de linfocitos T citotóxicos CD8+ y respuestas de inmunoglobulina específicas de antígeno asociadas con el isotipo de tipo TH1.

Los adyuvantes que son capaces de estimulación preferencial de la respuesta celular TH1 se describen en las solicitudes de patente internacional N° WO 94/00153 y WO 95/17209. El monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) es uno de dichos adyuvantes, y es preferente. Esto se conoce a partir del documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4,5 ó 6 cadenas aciladas y es fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Una forma preferente de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se describe en la patente Europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA). De manera alternativa, pueden usarse otros derivados no tóxicos de LPS.

Preferentemente, las partículas de 3D-MPL son suficientemente pequeñas para ser filtradas de manera estéril a través de una membrana de 0,22 micrómetros (patente europea N° 0 689 454). 3D-MPL estará presente en el intervalo de 10  $\mu\text{g}$  - 100  $\mu\text{g}$ , preferentemente 25 - 50  $\mu\text{g}$  por dosis, en el que el antígeno estará presente típicamente en un intervalo de 2 - 50  $\mu\text{g}$  por dosis.

Otro adyuvante preferente comprende QS21, una fracción no tóxica purificada de Hplc derivada de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. Opcionalmente, este puede mezclarse con monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), o un derivado de LPS no tóxico, opcionalmente junto con un vehículo.

El procedimiento de producción de QS21 se divulga en la patente US N° 5.057.540.

Las formulaciones de adyuvantes no reactogénicos que contienen QS21 se han descrito previamente (documento WO 96/33739). Dichas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol han demostrado ser adyuvantes estimulantes de TH1 exitosos cuando se formulan junto con un antígeno.

Los adyuvantes adicionales que son estimuladores preferenciales de la respuesta celular TH1 incluyen oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo secuencias CpG no metiladas, tal como se divulga en el documento WO 96/02555.

Se contempla también que las combinaciones de diferentes adyuvantes estimulantes de TH1, tales como los indicados anteriormente, proporcionen un adyuvante que es un estimulador preferencial de la respuesta celular TH1. Por ejemplo, QS21 puede formularse junto con 3D-MPL. La relación de QS21: 3D-MPL será típicamente del orden de 1:10 a 10:1; preferentemente de 1:5 a 5:1 y, frecuentemente, sustancialmente 1:1. El intervalo preferente para una sinergia óptima es de 2,5:1 a 1:1 de 3D-MPL:QS21.

Preferentemente, también hay presente un vehículo en la composición de vacuna según la invención. El vehículo puede ser una emulsión de aceite en agua, o una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

Una emulsión preferente de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, tocoferol alfa y Tween 80. En un aspecto particularmente preferente, los antígenos en la composición de vacuna según la invención se

combinan con QS21 y 3D-MPL en dicha una emulsión. Además, la emulsión de aceite en agua puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

5 Típicamente, para la administración humana, QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo de 1 µg - 200 µg, tal como 10 - 100 µg, preferentemente de 10 µg - 50 µg por dosis. Típicamente el aceite en agua comprenderá del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de alfa tocoferol y del 0,3 al 3% de Tween 80. Preferentemente, la relación escualeno:alfa tocoferol es igual o menor de 1, ya que esto proporciona una emulsión más estable. Span 85 puede estar presente también a un nivel del 1%. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente divulgación contengan además un estabilizador.

10 Las emulsiones no tóxicas de agua en aceite contienen preferentemente un aceite no tóxico, por ejemplo escualano o escualeno, un emulsionante, por ejemplo, Tween 80, en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

15 La presente divulgación proporciona también una composición de vacuna polivalente que comprende una formulación de vacuna de la divulgación en combinación con otros antígenos, en particular antígenos útiles para tratar cánceres, enfermedades autoinmunes y afecciones relacionadas. Dicha composición de vacuna polivalente puede incluir un adyuvante inductor de TH-1, tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

#### Composición de subunidades

20 Preferentemente, la composición de la presente divulgación está en la forma de una composición de subunidades. Las composiciones de subunidades son composiciones en las que los componentes han sido aislados y purificados a una pureza de al menos el 50%, preferentemente de al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90% antes de mezclar los componentes para formar la composición antigénica.

25 Las composiciones de subunidades pueden comprender soluciones acuosas de proteínas solubles en agua. Pueden comprender detergente, preferentemente no iónico, detergente zwitteriónico o iónico con el fin de solubilizar las partes hidrófobas de los antígenos. Pueden comprender lípidos de manera que puedan formarse estructuras de liposomas, permitiendo la presentación de antígenos con una estructura que se extiende por una membrana lipídica. A continuación, se proporcionan detalles adicionales acerca de las composiciones.

30 La composición de subunidades de la invención puede comprender también al menos un antígeno adicional que puede ser soluble, o puede ser presentado sobre la membrana externa de una ampolla (OMV) (formando, de esta manera, una composición mixta de subunidades/ampolla).

35 Las infecciones por *Neisseria* progresan a través de varias etapas diferentes. Por ejemplo, el ciclo de vida meningocócico implica colonización nasofaríngea, fijación a la mucosa, introducción en el torrente sanguíneo, multiplicación en la sangre, inducción de choque tóxico, paso de la barrera sangre/cerebro y multiplicación en el líquido cefalorraquídeo y/o las meninges. Diferentes moléculas sobre la superficie de la bacteria participarán en diferentes etapas del ciclo de infección. Al dirigir la respuesta inmunitaria contra una cantidad eficaz de una combinación de antígenos particulares, implicados en diferentes procesos de infección por *Neisseria*, puede conseguirse una vacuna de *Neisseria* con una alta eficacia sorprendente.

40 En particular, las combinaciones de ciertos antígenos de *Neisseria* de diferentes clases con la proteína NspA de la divulgación pueden provocar una respuesta inmunitaria que protege contra múltiples etapas de la infección. Dichas combinaciones de antígenos pueden conducir sorprendentemente a una eficacia de la vacuna contra la infección por *Neisseria* sinérgicamente mejorada donde, de manera óptima, la respuesta inmune tiene como objetivo más de una función de la bacteria. Algunos de los antígenos adicionales que pueden incluirse están implicados en la adhesión a las células huésped, algunos están implicados en la adquisición de hierro, algunos son autotransportadores y algunos son toxinas. Debido a que NspA es una adhesina, es preferente que sea mezclada con una proteína de adquisición de hierro, autotransportador o toxina, o una proteína de adquisición de hierro y un autotransportador, o una proteína de adquisición de hierro y una toxina, o un autotransportador y una toxina, o una proteína de adquisición de hierro y un autotransportador y una toxina.

Una ventaja adicional de la divulgación es que la combinación de los antígenos de la divulgación de diferentes familias de proteínas en una composición inmunogénica permitirá la protección contra una gama de cepas más amplia.

50 La presente divulgación se refiere también a una combinación de NspA de la divulgación con uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) proteínas de *Neisseria* diferentes. Dichas proteínas adicionales pueden ser seleccionadas de entre el grupo que consiste en: FhaB, Hsf, NadA, Hap, FrpA, FrpB, FrpC, LPS inmutotipo L2, LPS inmutotipo L3, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, TspA, TspB, PilQ, omp85 y PldA.

La divulgación se refiere también a composiciones inmunogénicas que comprenden una pluralidad de proteínas seleccionadas de entre al menos dos categorías diferentes de proteína, que tienen diferentes funciones en *Neisseria*. Los ejemplos de dichas categorías de proteínas son adhesinas, proteínas autotransportadoras, toxinas y proteínas de adquisición de Fe. Las combinaciones de vacunas de la divulgación muestran una mejora sorprendente en la eficacia de la vacuna contra las cepas de *Neisseria* homólogas (cepas a partir de las cuales se derivan los antígenos) y, preferentemente, también contra las cepas de *Neisseria* heterólogas.

En particular, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez antígenos de *Neisseria* diferentes (uno de los cuales es la NspA de la divulgación; clasificados como una adhesina u otra proteína externa de la membrana) seleccionados de entre al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco grupos de proteínas diferentes seleccionados de entre los siguientes:

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

preferentemente:

- al menos una adhesina de *Neisseria* seleccionada de entre el grupo que consiste en FhaB, Hsf y NadA;
- al menos un autotransportador de *Neisseria* seleccionado de entre el grupo que consiste en Hsf, Hap y NadA;
- al menos una toxina de *Neisseria* seleccionada de entre el grupo que consiste en FrpA, FrpC y uno o ambos de LPS inmutotipo L2 y LPS inmutotipo L3;
- al menos una proteína de adquisición de Fe de *Neisseria* seleccionada de entre el grupo que consiste en TbpA, TbpB, LbpA y LbpB; y
- al menos una proteína de membrana externa de *Neisseria* seleccionada de entre el grupo que consiste en TspA, TspB, PilQ, OMP85 y PldA.

Preferentemente, los primeros cuatro grupos (y más preferentemente la totalidad de los 5 grupos) de antígeno están representados en la composición inmunogénica de la divulgación.

Tal como se ha indicado anteriormente, cuando una proteína es mencionada específicamente en la presente memoria, es preferentemente una referencia a una proteína de longitud completa nativa, pero puede englobar también fragmentos antigénicos de la misma (particularmente en el contexto de vacunas de subunidades). Estos son fragmentos que contienen o que comprenden al menos 10 aminoácidos, preferentemente 20 aminoácidos, más preferentemente 30 aminoácidos, más preferentemente 40 aminoácidos o más preferentemente 50 aminoácidos, tomados contiguamente a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, los fragmentos antigénicos denotan fragmentos que son inmunológicamente reactivos con anticuerpos generados contra las proteínas de *Neisseria* o con anticuerpos generados por infección de un huésped mamífero con *Neisseria*. Los fragmentos antigénicos incluyen también fragmentos que cuando se administran en una dosis eficaz, provocan una respuesta inmune protectora contra la infección por *Neisseria*, más preferentemente son protectores contra la infección por *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae*, más preferentemente son protectores contra la infección por serogrupo B de *N. meningitidis*.

También están incluidas en la divulgación las proteínas de fusión recombinante de proteínas de *Neisseria* de la divulgación, o fragmentos de las mismas. Estas pueden combinar diferentes proteínas de *Neisseria* o fragmentos de las mismas en la misma proteína. De manera alternativa, la divulgación incluye también proteínas de fusión individuales de proteínas de *Neisseria* o fragmentos de las mismas, tales como una proteína de fusión con secuencias heterólogas

tales como un proveedor de epítomos de linfocitos T, o proteínas de superficie de virus, tales como hemaglutinina del virus de la gripe, toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, CRM197.

Composiciones, kits y administración

5 Tal como se ha indicado anteriormente, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una proteína NspA para su administración a una célula o a un organismo multicelular.

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

10 La divulgación se refiere también a composiciones que comprenden una proteína descrita en la presente memoria o sus agonistas o antagonistas. Las proteínas de la divulgación pueden ser empleadas en combinación con un vehículo o vehículos no estériles o estériles para su uso con células, tejidos u organismos, tales como un vehículo farmacéutico adecuado para la administración a un individuo. Dichas composiciones comprenden, por ejemplo, un medio aditivo o una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la divulgación y un vehículo o excipiente farmacéuticamente  
15 aceptable. Dichos vehículos pueden incluir, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y sus combinaciones. La formulación debería adecuarse al modo de administración. La invención se refiere además a paquetes y kits diagnósticos y farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención indicadas anteriormente.

20 Las proteínas y otros compuestos de la divulgación pueden emplearse solos o en conjunción con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de cualquier manera eficaz y conveniente incluyendo, por ejemplo, administración por vía tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica, entre otras.

25 En terapia o como profiláctico, el agente activo puede administrarse a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo como una dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica.

La composición se adaptará a la vía de administración, por ejemplo por una vía sistémica o una vía oral. Las formas preferentes de administración sistémica incluyen inyección, típicamente mediante inyección intravenosa. Pueden usarse otras vías de inyección, tales como subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Los medios alternativos para administración sistémica incluyen administración transmucosal y transdérmica usando penetrantes, tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Además, si una proteína u otros compuestos de la presente divulgación  
30 pueden ser formulados en una formulación entérica o encapsulada, la administración oral también puede ser posible. La administración de estos compuestos también puede ser tópica y/o localizada, en forma de ungüentos, pastas, geles, soluciones, polvos y similares.

35 Para la administración a mamíferos, y particularmente seres humanos, se espera que el nivel de dosificación diario del agente activo será de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg, típicamente de aproximadamente 1 mg/kg. En cualquier caso, el médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un individuo y variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso medio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se requieran intervalos de dosificación mayores o menores, y estos están incluidos en el alcance de la presente divulgación.

40 El intervalo de dosificación requerido depende de la elección del péptido, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la afección del sujeto y el juicio del médico. Las dosis adecuadas, sin embargo, están comprendidas en el intervalo de 0,1-100 µg/kg del sujeto.

45 De manera conveniente, una composición de vacuna está en forma inyectable. Pueden emplearse adyuvantes convencionales para mejorar la respuesta inmune. Una dosis unitaria adecuada para la vacunación es 0,5-5 microgramo/kg de antígeno y, preferentemente, dicha dosis es administrada 1-3 veces y con un intervalo de 1-3 semanas. Con el intervalo de dosis indicado, no se observarán efectos toxicológicos adversos con los compuestos de la divulgación que impedirían su administración a individuos adecuados.

50 Sin embargo, pueden esperarse amplias variaciones en la dosificación necesaria en vista de la variedad de compuestos disponibles y las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera dosificaciones más altas que la administración mediante inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para optimización, tal como se entiende bien en la técnica.

Las características preferentes y la realización de la presente invención se describirán ahora adicionalmente con referencia a los Ejemplos siguientes:

### **Ejemplo 1 Preparación de NspA nativa (proteína de superficie de Neisseria A)**

5 El ADN genómico de la cepa H44/76 de *Neisseria meningitidis* se preparó usando el kit de preparación genómico Quiagen. La parte del gen NspA que codifica la proteína NspA madura, es decir sin el péptido señal de 19 aminoácidos, se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico H44/76 usando el par de cebadores 5' gctacatatggaaggcgcatccggcttttacg y 5' gctaggatcctcagaatttgacgcgcacaccgg.

10 El producto de PCR resultante se clonó en pCRII-TOPO (Invitrogen), se digirió con NdeI y BamHI y se ligó en pET11a (Novagen). El plásmido resultante pET11a-NspA se transformó en células BL21-DE3 (Novagen). Cinco litros de estas células se cultivaron a 37°C en caldo de Luria que contenía 100 ug/ml de ampicilina. Después de alcanzar un valor OD600 de 0,6, se añadió isopropil-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) 1 mM durante 2 horas (de manera alternativa 4 horas adicionales con IPTG 0,1 mM). Las células se recogieron y se lavaron con 600 ml de 0,9% (p/v) de NaCl. La NspA estaba presente como cuerpos de inclusión. El sedimento celular se resuspendió en 100 ml de tampón TE enfriado con hielo (Tris/HCl 50 mM + EDTA 40 mM pH 8,0). Se añadieron veinticinco gramos de sacarosa y 20 mg de lisozima durante 30 minutos con agitación. Se añadieron cien ml de TE y se continuó la agitación durante otros 30 minutos. A continuación, fracciones de 100 ml se sometieron a ultrasonidos (sonicador Branson), se añadieron 4 ml de 10% de Brij con otra ronda de sonicación. Las suspensiones se centrifugaron 30 minutos a 4.000 rpm. El sedimento que contenía los cuerpos de inclusión se lavó una vez con tampón TE, se resuspendió en 40 ml de Tris/HCl 10 mM pH 8,3, se centrifugó en alícuotas (8.000 rpm centrifuga de Eppendorf) y se congeló a -20°C.

20 Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en Tris/HCl 20 mM + glicina 0,1 M + urea 8 M, pH 8,0.

25 La proteína NspA desnaturalizada solubilizada se replegó mediante dilución (1:20) en etanolamina 20 mM que contenía 0,5% de SB-12 purificado (3-dimetildodecilamoniopropanosulfonato, Fluka-DodMe2NprSO3). SB-12 se purificó pasando una solución concentrada del detergente en metanol/cloroformo (1:1) sobre una columna de AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. De manera alternativa, se realizó una dilución de 5 veces en etanolamina 20 mM, pH 11, que contenía 1% (p/v) de SB-12 purificado (3-dimetildodecilamoniopropanosulfonato, Fluka). La solución se dejó bajo agitación durante la noche, a temperatura ambiente.

30 El replegamiento se evaluó mediante SDS-PAGE semi-nativo (es decir, con SDS mínimo necesario, bajo amperaje, a 4°C), que revela la NspA replegada como una forma que tiene un desplazamiento más lento en comparación con la NspA desnaturalizada (5 min hirviendo con 1% de SDS). Esto es consistente con su comportamiento de desplazamiento cuando está presente en envolturas celulares nativa, tal como se informa en la literatura. Tal como se determina mediante tinción de plata de los geles, se consiguió una eficiencia de replegamiento del 100%. Normalmente, los geles contenían generalmente el 14% de acrilamida, sin SDS en el gel y sólo el 0,03% de SDS en el tampón de muestra 3X (que comprendía además Tris 0,1 M pH 6,8, 15,4% de glicerol, el 7,7% de β-mercaptoetanol y el 0,008% (p/v) de azul de bromofenol), y no se calentaron antes de la electroforesis.

35 Para purificar adicionalmente la NspA plegada, la mezcla se cargó en una columna mono S de 1 ml (Pharmacia), se pre-equilibró con DodMe2NprSO3 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,5 (tampón A). Antes de la carga, el pH de la muestra de proteína se ajustó a pH 8,5 usando HCl 1 M. La columna se lavó con tampón A, y las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 0-500 mM NaCl en tampón A, volumen total de 50 ml.

40 Aunque generalmente los OMPs son modificables por calor, es decir, los monómeros plegados se desplazan más rápido en geles de SDS-PAGE que las proteínas desnaturalizadas por calor, por el contrario se observó que NspA migraba más lentamente en el gel después del replegamiento. La proteína desnaturalizada migró a una masa de ~18 kDa, mientras que la proteína plegada migró a 22 kDa, lo que concuerda bien con la movilidad electroforética de NspA nativa aislada a partir de membranas de *Neisseria* (Moe et al. 1999 I&I 67:5664). Experimentos de ultracentrifugación analítica y entrecruzamiento químico confirmaron que la NspA replegada era un monómero (es decir, no dimerizada) en una solución que contenía detergente, según confirma su estructura cristalina (véase más adelante).

### **Ejemplo 2-Evidencia de la estructura plegada apropiadamente de la NspA replegada**

Además de la evidencia indicada anteriormente de que la NspA replegada migró en un gel de la misma manera que la NspA nativa aislada a partir de membranas de *Neisseria*, se llevaron a cabo otros 2 indicadores de replegamiento apropiado.

50 La NspA replegada se inyectó en ratones, y los sueros obtenidos resultantes eran capaces de reconocer la NspA nativa (no desnaturalizada) en un ensayo ELISA.

La NspA replegada se usó también para generar cristales de alta calidad a partir de los cuales se resolvió la estructura cristalina de la NspA de *Neisseria* plegada (Vandeputte-Rutten et al 2003 JBC 278:24825).

**Ejemplo 3 - Actividad bactericida en suero de anticuerpos contra NspA en combinación con TbpA y Hsf**

5 Se usó una cepa H66/76 de *N. meningitidis* en la que se interrumpieron la expresión de PorA y la síntesis de polisacáridos capsulares (véase el documento WO 01/09350) como cepa de fondo para regular, de manera creciente, la expresión de TbpA y Hsf, o de NspA usando los procedimientos descritos en el documento WO 01/09350. Se prepararon vesículas de membrana externa a partir de las cepas. La TbpA puede ser regulada, de manera creciente, genéticamente o haciendo crecer la cepa de producción en condiciones de baja concentración de hierro.

10 Las preparaciones de vesículas de membrana externa se adsorbieron sobre Al(OH)<sub>3</sub> y se inyectaron en ratones en los días 0, 21 y 28. En el día 42, los ratones se sangraron y se prepararon los sueros. Los sueros contra OMVs con regulación creciente de TbpA y Hsf se mezclaron con sueros de ratones vacunados con OMVs con regulación creciente de NspA y se realizaron ensayos bactericidas en suero tal como se indica a continuación.

La actividad bactericida del suero de los antisueros de ratones inoculados con OMVs se compararon en ensayos usando la cepa homóloga H44/76 o la cepa heteróloga Cu385. Se ha demostrado que el ensayo bactericida en suero muestra una buena correlación con la protección y, por lo tanto, es una buena indicación de la eficacia con la que una composición candidata provocará una respuesta inmune protectora.

15 Las cepas de tipo salvaje del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (cepa H44/76 = B:15 P1.7,16 L3, 7, 9 y cepa CU385 = B: 4 P1.19,15 L3, 7, 9) se cultivaron durante la noche en placas de Petri con MH + 1% de Polyvitex + 1% de suero de caballo a 37°C + 5% de CO<sub>2</sub>. Se sub-cultivaron durante 3 horas en un medio TSB líquido suplementado con 50 µM de Desferal (quelante de hierro) a 37°C con agitación para alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0,5 a 470 nm.

20 Los sueros agrupados o individuales se inactivaron durante 40 min a 56°C. Las muestras de suero se diluyeron 1/100 en HBSS-BSA 0,3% y, a continuación, se diluyeron en serie dos veces (8 diluciones) en un volumen de 50 µl en microplacas de fondo redondo.

25 Las bacterias, a la OD apropiada, se diluyeron en HBSS-BSA 0,3% para producir 1,3 10e4 UFC por ml. Se añadieron 37,5 µl de esta dilución a las diluciones de suero y las microplacas se incubaron durante 15 minutos a 37°C bajo agitación. A continuación, se añadieron 12,5 µl de complemento de conejo a cada pocillo. Después de 1 hora de incubación a 37°C y bajo agitación, las microplacas se colocaron en hielo para detener la eliminación.

30 Usando el procedimiento de inclinación, se colocaron 20 µl de cada pocillo en placas de Petri con MH + 1% de Polyvitex + 1% de suero de caballo y se incubaron durante la noche a 37°C + CO<sub>2</sub>. Se realizó un recuento de las UFC y se calculó el porcentaje de eliminación. La titulación bactericida en suero es la última dilución de suero que proporciona un rendimiento de eliminación ≥ 50%.

Se cree que los ratones producen un nivel considerable de anticuerpos bactericidas si las titulaciones son mayores de 1/100, particularmente en experimentos que usan la cepa heteróloga.

Resultados

35 Los resultados se muestran en la tabla siguiente. En los ensayos que usan la cepa H44/76 homóloga, la adición de anticuerpos contra NspA, no produjo una titulación bactericida en suero más alta que la producida usando anticuerpos contra TbpA y Hsf solo.

Sin embargo, la adición de anticuerpos contra NspA fue ventajosa en ensayos bactericidas en suero usando una cepa heteróloga. Los anticuerpos contra NspA resultaron eficaces para incrementar la titulación bactericida en suero contra la cepa CU385.

Mezcla antiséptica	Titulación bactericida sérica	
	H44/76	CU385
Anti TbpA-Hsf y suero no inmune	5378	2141
Anti TbpA-Hsf y anti-NspA	4738	2518

40 NspA, cuando se combina con TbpA y/o Hsf en una cantidad eficaz (con regulación creciente), es capaz de mejorar el carácter bactericida mixto de los sueros generados contra la vacuna combinada.

Aunque la invención ha sido descrita en conexión con realizaciones preferentes específicas, debería entenderse que la invención, tal como se reivindica, no debería limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de replegamiento de una proteína NspA que comprende poner en contacto la proteína NspA con un tampón de replegamiento alcalino que comprende 3-dimetildodecilamoniopropanosulfonato (SB-12).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tampón de replegamiento comprende etanolamina y SB-12.
- 5 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la etanolamina es etanolamina 20 mM.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tampón de replegamiento tiene pH11.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que SB-12 es SB-12 al 0,2%.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el SB-12 es SB-12 al 0,5%.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el SB-12 está purificado.
- 10 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el SB-12 es purificado haciéndolo pasar sobre una columna de  $AL_2O_3$ .
9. Un procedimiento que comprende las etapas siguientes:
  - a. expresar una proteína NspA en una célula huésped;
  - b. romper la célula huésped para obtener un cuerpo de inclusión que comprende la proteína NspA;
  - 15 c. lavar el cuerpo de inclusión;
  - d. solubilizar al menos parte del cuerpo de inclusión y la proteína NspA;
  - e. poner en contacto la proteína NspA solubilizada con el tampón de replegamiento de las reivindicaciones 1-8; y
  - f. eliminar el tampón de replegamiento de la proteína NspA.

20

**Figura 1**



Figura 2

NspA-ADN

GAAGGCGCATCCGGCTTTTACGTCCAAGCCGATGCCGCACACGCAAAGCCTCAAGCTCTTTA  
GGTTC TGCCAAAGGCTTCAGCCCGCGCATCTCCGCAGGCTACCGCATCAACGACCTCCGC  
TTCGCCGTCGATTACACGCGCTACAAAACTATAAAGCCCCATCCACCGATTTCAAACCTT  
TACAGCATCGGCGCGTCCGCCATTTACGACTTCGACACCCAATCGCCCGTCAAACCGTAT  
CTCGGCGCGCGCTTGAGCCTCAACCGCGCCTCCGTCGACTTGGGCGGCAGCGACAGCTTC  
AGCCAAACCTCCATCGGCCTCGGCGTATTGACGGGCGTAAGCTATGCCGTTACCCCGAAT  
GTCGATTTGGATGCCGGCTACCGCTACAAC TACATCGGCAAAGTCAACACTGTCAAAAAC  
GTCCGTTCCGGCGAACTGTCCGCCGGTGTGCGCGTCAAATCTGA

Proteína NspA

EGASGFYVQADAAHAKASSSLGSAKGFSPRISAGYRINDLRFVVDYTRYKNYKAPSTDFKLYSIGASAIYDFDTQSPVKP  
YLGARLSLNRASVDLGGSDSFSQTSIGLVLTGVSYAVTPNVLDAGYRYNYIGKVNIVKNVRSGELSAGVRVKF

Figura 3

Sec. NspA H44/76

ATGAAAAAAGCAC TTGCCACACTGATTGCCCTCGCTCTCCCGCCGCGCCACTGGCGGAAGGCGCATCCGGCTTTTACGT  
CAAGCCGATGCCGCACACGCAAAAGCCTCAAGCTCTTTAGGTTCTGCCAAAGGCTTCAGCCCGCGCATCTCCGCAGGCT  
ACCGCATCAACGACCTCCGCTTCGCCGTCGATTACACGCGCTACAAAACTATAAAGCCCCATCCACCGATTTCAAACCT  
TACAGCATCGGCGCGTCCGCCATTTACGACTTCGACACCCAAATCGCCCGTCAAACCGTATCTCGGCGCGCGCTTGAGCCT  
CAACCGCGCTCCGTCGACTTGGGCGGCAGCGACAGCTTCAGCCAAACCTCCATCGGCCTCGGCGTATTGACGGGCGTAA  
GCTATGCCGTTACCCCGAATGTCGATTTGGATGCCGGCTACCGCTACAACCTACATCGGCAAAGTCAACACTGTCAAAAAC  
TCCGTTCCGGCGAACTGTCCGTCGGCGTGCGCGTCAAATTCGA

Pro NspA H44/76

MKKALATLIALALPAAALAE GASGFYVQADAAHAKASSSLGSAKGFSPRISAGYRINDLRFVDYTRYKNYKAPSTDFKL  
YSIGASAIYDFDTQS PVKPYLGARLSLNRASVDLGGSDSFSQTS IGLGVLTGVS YAVTPNVLDAGYRYNYIGKVNTVKM  
VRSGELSVGVRVKF .