

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 499**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

C12N 15/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2005** **E 10183544 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014** **EP 2279747**

54 Título: **Vesículas bacterianas inmunogénicas con proteínas de membrana externa**

30 Prioridad:

29.10.2004 GB 0424092

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

15.10.2014

73 Titular/es:

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

**Via Fiorentina 1
53100 Siena (SI), IT**

72 Inventor/es:

**ADU-BOBIE, JEANNETTE;
PIZZA, MARIAGRAZIA;
NORAIS, NATHALIE;
FERRARI, GERMANO y
GRANDI, GUIDO**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 507 499 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 bacterianas inmunogénicas con proteínas de membrana externa.

5 CAMPO TECNICO

Esta invención está en el campo de la preparación de vesículas con propósitos de inmunización.

10 ANTECEDENTES DE LA TECNICA

Uno de los varios enfoques para inmunizar contra la infección por *N.meningitidis* es usar vesículas de membrana externa (OMVs). Una vacuna OMV eficaz contra el serogrupo B ha sido producida por el Norwegian National Institute of Public Health [por ejemplo, ref. 1] pero, aunque esta vacuna es segura y evita la enfermedad MenB, su eficacia está limitada a la cepa homóloga usada para hacer la vacuna.

La vacuna 'RIVM' está basada en OMVs que contienen seis subtipos de PorA diferentes. Ha demostrado ser inmunogénica en niños en ensayos clínicos de fase II [2].

La referencia 3 describe una vacuna contra diferentes serotipos patógenos del meningococo del serogrupo B basada en OMVs que conservan un complejo de proteínas de 65-kDa. La referencia 4 describe una vacuna que comprende OMVs de cepas meningocócicas diseñadas genéticamente, con las OMVs que comprende: al menos una proteína de membrana externa (OMP) Clase 1 pero no comprende una OMP Clase 2/3. La referencia 5 describe OMVs que comprenden OMPs que tienen mutaciones en sus bucles de superficie y OMVs que comprenden derivados de lipopolisacárido meningocócico (LPS).

Además de la *N.meningitidis* del serogrupo B, las vesículas han sido preparadas para otras bacterias. La referencia 6 describe un proceso para preparar vacunas basadas en OMV para el meningococo del serogrupo A. Las referencias 7 y 8 describen vesículas de la *N.gonorrhoeae*. La referencia 9 describe preparaciones de vesículas para la *N.lactamica*. Las vesículas han sido preparadas de *Moraxella catarrhalis* [10,11], *Shigella flexneri* [12,13], *Pseudomonas aeruginosa* [12,13], *Porphyromonas gingivalis* [14], *Treponema pallidum* [15], *Haemophilus influenzae* [16 & 21] y *Helicobacter pylori* [17].

El fallo de las OMVs para provocar una protección cruzada contra las cepas no homólogas no es bien entendido, particularmente ya que la mayoría de los aislados de *N.meningitidis* comparten un pequeño número de antígenos de superficie protectores conservados que, si están presentes en las OMVs, se esperaría que proporcionasen cobertura protectora amplia. Una posible explicación para el fallo es la existencia de antígenos de superficie inmune-dominantes variables que evitan que los antígenos conservados ejerzan su acción protectora y la presencia de proteínas híper-variables inmune-dominantes como la PorA se ha documentado y demostrado extensamente. Otras posibles explicaciones son que los métodos para la preparación DEOMV resultan en la contaminación con proteínas citoplasmáticas y/o de la membrana interna que diluyen las proteínas de la membrana externa protectoras, o que los antígenos se pierden por la extracción con detergente.

Ha habido varias propuestas para mejorar la eficacia de las OMV. La referencia 18 describe composiciones que comprenden OMVs suplementadas con proteínas de unión a transferrina (por ejemplo, TbpA y TbpB) y/o Cu, Zn superóxido dismutasa. La referencia 19 describe composiciones que comprenden OMVs suplementadas por varias proteínas. La referencia 20 describe preparaciones de vesículas de membrana de *N.meningitidis* con un gen *fur* modificado. La referencia 21 enseña que la expresión de *nspA* debería ser sobre-regulada con bloqueos de *porA* y *cps* concomitantes. Mutantes bloqueados adicionales de la *N.meningitidis* para la producción de OMV se describen en las referencias 21 a 23. A diferencia de estos intentos de mejorar las OMVs cambiando los patrones de expresión, la referencia 24 se enfoca en cambiar los métodos para la preparación de OMV, y enseña que los antígenos como el NspA pueden ser retenidos durante la extracción de vesículas evitando el uso de detergentes como el desoxicolato.

Es un objeto de la invención el proporcionar preparaciones de vesículas mejoradas y adicionales, junto con procesos para su fabricación. En particular, es un objeto de la invención el proporcionar vesículas que conserven componentes inmunogénicos bacterianos importantes de la *N.meningitidis*.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que la interrupción en las vías implicadas en la degradación del peptidoglicano (la capa murina) da la bacteria que libera vesículas en el medio de cultivo, y que estas vesículas son ricas en proteínas de la membrana externa inmunogénicas y pueden provocar respuestas inmunes bactericidas de amplio alcance. Las vesículas son diferentes de las OMVs que pueden ser preparadas interrumpiendo bacterias completas (por ejemplo, por sonicación y extracción de sarcosilo [25]), y pueden ser preparadas sin interrumpir las células bacterianas, por ejemplo simplemente separando las vesículas de las

bacterias por un proceso como la centrifugación.

En particular, los inventores han descubierto que el bloqueo del homólogo *mItA* meningocócico (también referido como 'GNA33' o 'NMB0033' [26]) lleva a la liberación espontánea de vesículas que son ricas en proteínas de la membrana externa inmunogénicas y que pueden provocar respuestas de anticuerpos ampliamente de protección cruzada con títulos bactericidas mayores que las OMVs preparadas por procesos de producción normales. Esta eficacia mejorada es sorprendente por dos razones: primero, se ha informado anteriormente que la proteína NMB0033 es altamente efectiva en el aumento de anticuerpos bactericidas (por ejemplo, ver la tabla 1 de la referencia 27) y que es un candidato de vacunas fuerte (ver por ejemplo la tabla 2 de la referencia 28), con una recomendación en la referencia 29 que debería ser regulada para la producción de vesículas, de tal manera que se esperaría que su pérdida a priori reduzca la eficacia bactericida en lugar de aumentarla; segundo, las cepas bloqueadas no tienen la organización topológica correcta de la membrana celular, y se ha informado previamente que las proteínas constituyentes principales de las OMVs normales (por ejemplo, la PorA, PIB, proteínas de membrana externa clase 4 y clase 5) son liberadas en el medio de cultivo [25]. Los inventores han descubierto ahora que la liberación informada anteriormente no implica la secreción de proteínas discretas, sino que en su lugar las proteínas de la membrana externa son liberadas en forma de vesículas. Estas vesículas son ventajosas sobre las OMVs preparadas por medios del estado de la técnica ya que son liberadas espontáneamente en el medio de cultivo y pueden por lo tanto ser preparadas simplemente y eficientemente sin la interrupción complicada y que consume tiempo y los métodos de purificación que son normalmente usados para preparar OMVs.

Por lo tanto la invención proporciona una bacteria que tiene una mutación de bloqueo de su gen *mItA*. La bacteria preferiblemente tiene también una mutación de bloqueo de al menos un gen adicional, por ejemplo los genes *porA* y/o *porB* y/o *lpxA*.

La invención también proporciona una bacteria, en donde: (i) la bacteria tiene una pared celular que incluye peptidoglicano; y (ii) la bacteria no expresa una proteína que tiene una actividad lítica transglicosilasa de la proteína MItA. La bacteria es preferiblemente una bacteria mutante, es decir, la bacteria es una cepa mutante de una especie del tipo salvaje que expresa la proteína MItA. La bacteria preferiblemente tampoco expresa al menos una proteína adicional, por ejemplo las proteínas *porA* y/o *porB* y/o *LpxA*.

La invención también proporciona una composición que comprende vesículas que, durante el cultivo de las bacterias de la invención, son liberadas en el medio de cultivo. Esta composición preferiblemente no comprende ninguna bacteria viva y/o completa. Esta composición puede ser usada para la preparación de vacunas.

La invención también proporciona una composición que comprende vesículas, en donde las vesículas están presente en el filtrado obtenible después de la filtración a través de un filtro de 0,22 µm de un medio de cultivo en el que se ha desarrollado una bacteria de la invención. Esta composición puede ser usada para la preparación de vacunas.

La invención también proporciona un proceso para preparar vesículas bacterianas, que comprende los pasos de: (i) cultivar una bacteria MItA⁻ en un medio de cultivo de tal forma que la bacteria libere vesículas en el mencionado medio; y (ii) recoger las vesículas de dicho medio. La bacteria MItA⁻ es preferiblemente un mutante de bloqueo Δ MItA. Las vesículas pueden ser recogidas por separación por tamaño (por ejemplo filtración, usando un filtro que permita que las vesículas pasen pero que no permita que pasen bacterias intactas), lo que puede ser realizado convenientemente después de la centrifugación para preferiblemente sedimentar células en relación a las vesículas más pequeñas (por ejemplo centrifugación a baja velocidad).

Metabolismo del peptidoglicano

El peptidoglicano (también conocido como mureína, mucopéptido o glicosaminopéptido) es un heteropolímero encontrado en la pared celular de la mayoría de las bacterias. El peptidoglicano es el componente que es principalmente responsable de la fuerza mecánica de la pared celular y para mantener la forma celular. En las bacterias Gram-positivas es el componente principal de la pared celular. En las bacterias Gram-negativas se produce como una capa entre las membranas citoplasmática y externa, y está ligado covalentemente con la membrana externa a través de la lipoproteína de Braun.

El peptidoglicano consiste principalmente de cadenas principales de heteropolisacáridos que están reticuladas por péptidos 'madre' para formar una estructura reticular. Es un polímero tan grande que se puede considerar como una única molécula ligada covalentemente inmensa. En la *E.coli* el esqueleto de sacárido está formado alternando residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc). Un residuo MurNAc puede estar ligado a un tetrapéptido madre. Los enlaces cruzados entre las cadenas principales están habitualmente formados directamente entre la D-alanina en un péptido madre y un meso-DAP de otro. La estructura de la *E.coli* es típica para las bacterias Gram-negativas, pero hay más variación dentro de las bacterias Gram-positivas, por ejemplo en la *S.aureus* el 30-50% de los residuos de ácido murámico no están acetilados, el péptido madre a menudo tiene L-lisina en vez de meso-DAP e isoglutamina en vez de D-glutamato, y los enlaces cruzados

pueden tener lugar entre péptidos madre.

El paso inicial en la biosíntesis del peptidoglicano de la *E.coli* es la formación del derivado UDP de GlcNAc, que tiene lugar en el citoplasma. Alguna UDP-GlcNAc es convertida a UDP-MurNAC en una reacción de UDP-GlcNAc y el fosfoenolpiruvato (PEP), catalizado por PEP:UDP-GlcNAc enolpiruvil transferasa. Todavía dentro del citoplasma, los aminoácidos son añadidos secuencialmente al UDP-MurNAC para formar un UDP-MurNAC-pentapéptido conocido como el 'nucleótido Partk' que incluye una D-alanil-D-alanina terminal. El nucleótido Park es entonces transferido al bactoprenol monofosfato en la membrana citoplasmática, donde el UDP-GlcNAc es también añadida para hacer una subunidad bactoprenol-disacárido-pentapéptido. La subunidad disacárido-pentapéptido es entonces transferida a la región periplásmica, con el bactoprenol-pirofosfato permaneciendo en la membrana. Dentro del periplasma la subunidad transferida es insertada en un peptidoglicano en desarrollo.

Para permitir la división celular deben tener lugar cambios en la forma, y la importación/exportación de complejos grandes (por ejemplo durante la conjugación) y después la degradación del peptidoglicano. En la *E.coli* esta degradación es causada por enzimas referidos como hidrolasas de mureina [30], que como familia incluyen transglicosilasas líticas (*mltA*, *mltB*, *mltC*, *mltD*, *sit70*, *emtA*), endopeptidasas (*pbp4*, *pbp7*, *mepA*) y amidasas (*amiC*). Las muramididasas como la lisozima escinden los mismos ligamientos β -(1-4)-glucosídicos entre los residuos MurNAC y GlcNAc, a diferencia de las muramididasas, sin embargo, las transglucosilasas escinden el enlace glucosídico con la formación concomitante de residuos de 1,6-anhidromuramoil (Anh-MurNAC).

Las vías anabólicas y catabólicas del peptidoglicano estándar están por lo tanto bien caracterizadas, como las variaciones y modificaciones menores que tienen lugar entre bacterias. Los enzimas están bien caracterizados, y las proteínas han sido anotadas fácilmente como estando implicadas en las vías cuando se han publicado nuevas secuencias genómicas bacterianas. El experto en la técnica puede por lo tanto determinar fácilmente los enzimas implicados en las vías metabólicas del peptidoglicano para cualquier bacteria dada, pueden identificar fácilmente los enzimas implicados, y pueden identificar fácilmente los genes que codifican esos enzimas.

La invención está basada en el bloqueo del gen *mltA*, que codifica una transglucosilasa lítica enlazada a la membrana. La familia MltA está reconocida en INTERPRO (entrada 'ipr005300') y PFAM (entrada 'MltA' o 'PF03562'), y el registro PFAM enumera proteínas MltA en bacterias tan diversas como *Rhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Rhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Zymomonas mobilis*, *Caulobacter crescentus*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium*, *Buchnera aphidicola*, *Photorhabdus luminescens*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Coxiella burnetii*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Haemophilus ducreyi*, *Pasteurella multocida*, *Chromobacterium violaceum*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Nitrosomonas europaea*, *Ralstonia solanacearum*, *Synechococcus elongatus*, *Gloeobacter violaceus*, y *Leptospira interrogans*.

El bloqueo del *mltA* puede resultar en virulencia disminuida, separación celular anormal, morfología celular anormal, septos no divididos, septos dobles, agrupación de células y el intercambio de membranas externas [25]. Al mismo tiempo, sin embargo, se ha descubierto que la mutación de bloqueo da bacterias que pueden producir vesículas espontáneamente que son inmunogénicas y están enriquecidas en las proteínas de la membrana externa.

Bacterias

La bacteria de la que se preparan las vesículas puede ser Gram-positivas, pero preferiblemente es Gram-negativa. La bacteria puede ser del género *Moraxella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Treponema*, *Porphyromonas* o *Helicobacter* (véase más arriba las especies preferidas) pero es preferiblemente del género *Neisseria*. Las especies preferidas de *Neisseria* son la *N.meningitidis* y la *N.gonorrhoeae*.

Así como tener un bloqueo del *mltA*, la bacteria también puede tener una o más mutaciones de bloqueo de otros genes. Para recudir la actividad pirogénica, por ejemplo, la bacteria debería tener niveles de endotoxina (LOS/LPS) bajos, y esto puede ser conseguido por el bloqueo de enzimas implicados en la biosíntesis de LPS. Las bacterias mutantes adecuadas ya son conocidas, por ejemplo la *Neisseria* mutante [31, 32] y la *Helicobacter* mutante [33]. Se prefiere el mutante *lpxA* del meningococo. Los procesos para preparar membranas externas vacías de LPS de bacterias Gram-negativas se describen en la referencia 34.

Así como tener bloqueos de genes endógenos particulares, la bacteria puede expresar uno o más genes que nos son endógenos. Por ejemplo, la invención puede usar una cepa recombinante que expresa nuevos genes en relación a la cepa del tipo salvaje correspondiente. La expresión de genes no endógenos de esta manera se puede conseguir por varias técnicas, por ejemplo inserción cromosómica (como se usa para introducir múltiples genes PorA [35]), bloqueando mutaciones, expresión de vectores extra-cromosómicos (por ejemplo plásmidos), etc.

Así como regular por disminución la expresión de proteínas específicas, la bacteria puede sobre-expresar (en relación a la cepa de tipo salvaje correspondiente) inmunógenos como NspA, proteína 287 [19], proteína 741

[36], TbpA [18] TbpB [18], superóxido dismutasa [18], etc.

La bacteria puede también incluir uno o más de las mutaciones de bloqueo y/o sobre-expresiones descritas en las referencias 16, 21-24 y/o 37-38. Los genes preferidos para la regulación por disminución y/o bloqueo incluyen: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, and/or TbpB [16]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, PorA, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, and/or TbpB [21]; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, and/or TbpB [37]; and (d) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, Opa, Opc, PilC, PorA, PorB, SiaD, SynA, SynB, y/o SynC [38].

Las vesículas pueden ser preparada del género *Escherichia*, como por ejemplo de la especie *E.coli*. Las cepas de *E.coli* han sido tradicionalmente clasificadas o como comensales o como patógenas, y las cepas patógenas son después sub-clasificadas como cepas intestinales o extraintestinales. La clasificación también se puede basar en los antígenos 'K'. El antígeno 'K' mejor estudiado es el 'K1', que se considera que es un determinante principal de la virulencia entre las cepas de *E.coli* que causan meningitis neonatal. Las vesículas de la invención pueden ser preparadas de cualquiera de estas cepas de *E.coli*, pero lo son preferiblemente de una cepa patógena, incluyendo una cepa patógena extraintestinal ('ExPEC' [39]), una cepa uropatógena (UPEC) o una cepa asociada a la meningitis/sepsis (MNEC). Las secuencias genómicas de cepas patógenas están disponibles en las bases de datos bajo los números de entrada AE005174, BA000007 y NC-004431. En lugar de usar un bloqueo de *mltA*, se puede preferir bloquear uno o más de los componentes del complejo *E.coli* Tol-Pal, como *el tolA*, *tolQ*, *tolB*, *pal* y/o *tolR*. Se prefiere el bloqueo de *tolR*. Los meningococos no tienen un homólogo del sistema Tol-Pal.

Composiciones de Vesículas

La invención proporciona las vesículas que son liberadas espontáneamente en el medio de cultivo por las bacterias de la invención. Estas vesículas son distintas de las vesículas que pueden ser preparadas artificialmente de las mismas bacterias, como las OMVs extraídas de sarcosilo preparadas en la referencia 25 de los meningococos ' Δ GNA33'. También son distintas de las microvesículas (MVs [41]) y las OMVs nativas ('NOMVs' [54]), aunque las vesículas de la invención parece que son más similares a las MVs y las NOMVs que a las OMVs extraídas de sarcosilo. Las vesículas son también distintas de las bullas, que son protrusiones de la membrana externa que permanecen unidas a las bacterias antes de la liberación como MVs [42, 43].

Las vesículas de la invención tienen un diámetro de 50-100 nm por microscopía electrónica, que es más pequeño que el de las OMVs meningocócicas artificiales (diámetro ~270nm [44]). El diámetro es aproximadamente el mismo que el de las OMVs artificiales que han sido desnaturalizadas por calor (~105nm [44]), pero las vesículas de la invención mantienen la antigenicidad mientras que las OMVs artificiales desnaturalizadas por calor pierden su antigenicidad. Además, las vesículas de la invención (a diferencia de las MVs, OMVs y NOMVs) están sustancialmente libres de contaminación citoplasmática.

Las vesículas de la invención contienen preferiblemente no más del 20% por peso de LOS/LPS, medido en relación a la proteína total (es decir debería haber al menos 4x más proteína que LOS/LPS, por peso). El nivel de LOS/LPS máximo es preferiblemente incluso más bajo del 20%, por ejemplo, 15%, 10%, 5% o menor.

A diferencia del cultivo inicial, las composiciones que contienen vesículas de la invención estarán sustancialmente libres de bacterias completas, ya sea vivas o muertas. El tamaño de las vesículas de la invención implica que pueden ser fácilmente separadas de las bacterias completas por filtración a través de un filtro de 0,22 μ m, por ejemplo como se usa típicamente para la esterilización por filtración. Así la invención proporciona un proceso para preparar vesículas de la invención que comprende filtrar el medio de cultivo de bacterias de la invención a través de un filtro que retarda las bacterias completas pero deja a las vesículas pasar a través de por ejemplo, un filtro de 0,22 μ m. Aunque las vesículas pasarán a través de filtros de 0,22 μ m estándar, estos pueden obstruirse fácilmente por otro material, y por lo tanto se prefiere realizar pasos secuenciales de esterilización por filtración a través de una serie de filtros de tamaño de poro decrecientes, finalizando con un filtro de esterilización estándar (por ejemplo un filtro de 0,22 μ m). Ejemplos de los filtros anteriores serán aquellos con tamaño de poro de 0,8 μ m, 0,45 μ m, etc. El filtrado puede ser tratado adicionalmente, por ejemplo por ultracentrifugación.

Las vesículas de la invención contienen lípidos y proteínas. El contenido de proteínas de las vesículas meningocócicas ha sido analizado, y sustancialmente todas las proteínas en las vesículas están clasificadas como proteínas de la membrana externa por análisis bioinformático. Las proteínas de la membrana externa vistan en las vesículas incluyen: pilE; serina endopeptidasa IgA-específica; PorA; FrpB; P1B; etc. A diferencia de las OMVs artificiales, que han sido analizadas anteriormente proteomicalmente [45], se descubrió que las vesículas de la invención carecen de proteínas como la MinD, FtsA y fosfoenolpiruvato sintasa. Las vesículas también carecen de MltA.

Las vesículas de la invención son ventajosas cuando se comparan con vesículas preparadas por interrupción de bacterias cultivadas debido a que no se requiere interrupción artificial. La separación basada en

tamaño simple puede ser usada para separar bacterias y vesículas, sin necesidad de tratamientos químicos, etc. Además de ser un proceso más simple, esto evita el riesgo de desnaturalización por detergentes, etc. que son usador durante los procesos preparativos de OMV del estado de la técnica.

5 Como se ha mencionado anteriormente, las vesículas de la invención pueden ser similares a microvesículas (MVs) y 'OMVs nativas' ('NOMVs'), que son vesículas de la membrana de origen natural que se forman espontáneamente durante el desarrollo bacteriano y son liberadas en el medio de cultivo. Las MVs pueden ser obtenidas cultivando *Neisseria* en medio de cultivo de caldo, separar las células completas del medio de cultivo de caldo (por ejemplo por filtración o por centrifugación a baja velocidad para sedimentar solamente células y no las vesículas más pequeñas) y después recoger las MVs que están presentes en el medio vacío de células (por ejemplo por filtración, por precipitación diferencial o agregación de MVs, por centrifugación de alta velocidad para sedimentar las MVs). Las cepas para su uso en la producción de MVS pueden ser seleccionadas generalmente en base a la cantidad de MVs producidas en el cultivo. Las referencias 46 y 47 describen *Neisseria* con producción de MV alta.

15 **Combinaciones de vesículas**

La invención permite la producción de vesículas inmunogénicas de una bacteria de elección. La bacteria será típicamente generada por mutación de una cepa de partida elegida. Cuando hay múltiples cepas de partida de interés entonces la invención proporciona métodos para preparar vesículas de cada una de las cepas, y las diferentes vesículas pueden ser combinadas. Esta estrategia de combinación es particularmente útil para bacterias donde la variación cepa-a-cepa implica que una única cepa no ofrece habitualmente protección clínicamente útil, por ejemplo meningococo del serogrupo B.

20 Por lo tanto la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de n conjuntos de vesículas de la invención, preparada de n cepas diferentes de bacterias. El valor de n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, etc. Las diferentes cepas pueden estar en el mismo serogrupo o en serogrupos diferentes.

La invención también proporciona un kit que comprende vesículas de la invención preparadas de n cepas diferentes de una bacteria. Las vesículas pueden ser mantenidas y almacenadas de forma separada en el kit hasta que se requiera que sean usadas juntas, por ejemplo, como una mezcla, o para separar simultáneamente o el uso secuencial.

30 La invención también proporciona un proceso que comprende: preparar n conjuntos de vesículas de la invención, una de cada una de las n cepas diferentes de una bacteria; y combinando los n conjuntos de vesículas. Los diferentes conjuntos pueden ser combinados en un kit o en una mezcla.

La invención también proporciona el uso de vesículas de una primera cepa de una bacteria en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente, en donde el medicamento es administrado simultáneamente, separadamente o secuencialmente con vesículas de una segunda cepa de la bacteria.

40 La invención también proporciona el uso de vesículas de una primera cepa de una bacteria en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente, en donde el paciente ha sido pre-inmunizado con vesículas de una segunda cepa de la bacteria.

45 Las vesículas pueden ser seleccionadas de diferentes patógenos. Así la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de n conjuntos de vesículas de la invención, preparadas de n especies diferentes de bacterias. DE manera similar, la invención proporciona un kit que comprende vesículas de la invención preparadas de n especies diferentes de bacterias, y proporciona un proceso que comprende el paso de preparar n conjuntos de vesículas de la invención, uno de cada una de las n especies diferentes de bacterias.

50 **Expresión de MltA**

Las bacterias de la invención no poseen actividad enzimática de MltA funcional. La prevención de la expresión de la proteína MltA puede ser conseguida de dos maneras principales: eliminación o interrupción del gen *mltA* endógeno (incluyendo sus regiones de control) para dar una cepa $MltA^-$; o la supresión de la expresión de MltA en una cepa $MltA^+$. Se prefiere usar una cepa $MltA^-$.

60 Las cepas $MltA^-$ pueden ser construidas por técnicas de bloqueo convencionales. Las técnicas para el bloqueo de genes son bien conocidas, y se ha informado anteriormente de mutantes bloqueados de meningococos [por ejemplo, refs. 25 & 48-50]. El bloqueo es preferiblemente conseguido por la delección de al menos una porción de la región codificante (preferiblemente delección isogénica), pero se puede usar cualquier otra técnica adecuada, por ejemplo delección o mutación del promotor, delección o mutación del codón de inicio, etc. La bacteria puede contener un gen marcador en lugar de un gen bloqueado, por ejemplo, un marcador de resistencia antibiótica.

65 Cuando se usa la supresión de la expresión de un gen de *mltA* endógeno entonces se pueden usar

técnicas como la inhibición antisentido y ARN inhibidor, aunque estas técnicas se usan más típicamente en huéspedes eucariotas. En la bacteria resultante, el ARNm que codifica la proteína bloqueada estará sustancialmente ausente y/o su traducción será sustancialmente inhibida (por ejemplo a menos del 1% del nivel de expresión que se vería en ausencia de supresión).

5 Como alternativa al bloqueo o la supresión de la expresión, se puede usar mutagénesis dirigida al sitio del gen de *mltA* endógeno. La referencia 51 describe mutantes de MltA meningocócica en la que los residuos Glu255, Glu323 y ASp362 se mutaron y después se probaron para actividad catalítica de MltA. Un mutante E255G mostró una reducción del 50% de la actividad, y un mutante E323G mostró una reducción del 70% en la actividad. La mutagénesis de residuos específicos dentro de la región codificante de MltA puede por lo tanto ser usada como una técnica para bloquear la actividad enzimática de la transglicolasa lítica sin bloquear la región codificante.

10 Sea cual sea la técnica (o combinación de técnicas) elegida, la bacteria resultante estará sustancialmente libre de actividad enzimática de MltA.

15 **Composiciones farmacéuticas**

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) vesículas de la invención y (b) un portador farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona un proceso para preparar dicha composición, que comprende el paso de mezclar vesículas de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

20 Los 'portadores farmacéuticamente aceptable' típicos incluyen cualquier portador que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son típicamente macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (como gotitas de aceite o liposomas). Tales portadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares como humectantes o agentes emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH, sacarosa, y similares. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato, libre de pirógenos, estéril (por ejemplo pH 7,4) es un portador típico. Un debate a fondo de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 52.

25 Las composiciones de la invención estarán típicamente en forma acuosa (es decir soluciones o suspensiones) en lugar de en forma seca (por ejemplo liofilizada). Las composiciones acuosas son también adecuadas para reconstituir otras vacunas de una forma liofilizada (por ejemplo, una vacuna conjugada Hib liofilizada, una vacuna conjugada meningocócica liofilizada, etc.). Cuando una composición de la invención se va a usar para dicha reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit, que puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringuilla llena preparada y un vial, con los contenidos acuosos de la jeringuilla siendo usados para reactivar los contenidos secos del vial antes de la inyección.

30 Las composiciones de la invención pueden ser presentadas en viales, o pueden ser presentadas en jeringuillas llenas preparadas. Las jeringuillas pueden ser suministradas con o sin agujas. Las composiciones pueden ser envasadas en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiples. Una jeringuilla incluirá generalmente una dosis única de la composición, mientras un vial puede incluir una dosis única o dosis múltiples. Para las formas de dosis múltiples, por lo tanto, se prefieren los viales a las jeringuillas pre-llenadas.

35 Los volúmenes de dosificación efectivos pueden ser establecidos rutinariamente, pero una dosis típica humana de la composición tiene un volumen de alrededor de 0,5 ml, por ejemplo, para la inyección intramuscular. La vacuna basada en OMV RIVM se administró en un volumen de 0,5 ml [53] por inyección intramuscular en el muslo o la parte superior del brazo. Se pueden usar dosis similares para otras vías de administración, por ejemplo una vacuna basada en OMV intranasal para atomización puede tener un volumen de alrededor de 100 µl o alrededor de 130 µl por pulverizador [54], con cuatro pulverizadores administrados para dar una dosis total de alrededor de 0,5 ml.

40 El pH de la composición está preferiblemente entre 6 y 8, y más preferiblemente entre 6,5 y 7,5 (por ejemplo alrededor de 7 o alrededor de 7,4). El pH de la vacuna basada en OMV RIVM es 7,4 [55], y se prefiere un pH < 8 (preferiblemente < 7,5) para composiciones de la invención. Un pH estable puede ser mantenido por el uso de un tampón, por ejemplo un tampón Tris, un tampón de fosfato, o un tampón de histidina. Las composiciones de la invención incluirán generalmente un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [56], por ejemplo entre 1-10mM, preferiblemente alrededor de 5mM. La vacuna basada en OMV RIVM mantiene el pH usando un tampón Tris/HCl de 10mM. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas respecto a los humanos.

45 Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y son más preferiblemente composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden o ser profilácticas (es decir para prevenir la infección) o

5 terapéuticas (es decir para tratar la infección), pero serán típicamente profilácticas. Las composiciones
 10 inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de antígenos, así
 15 como otros componentes como sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente efectiva', se entiende que al
 administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una única dosis o como parte de una serie, es efectiva para
 el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a ser
 tratado, edad, grupo taxonómico del individuo a ser tratado (por ejemplo primate no humano, primate, etc.), la
 capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la
 formulación de la vacuna, la evaluación del doctor que está tratando de la situación médica y otros factores
 relevantes. Se espera que la cantidad caerá en un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado a
 través de pruebas rutinarias. El contenido de antígenos de las composiciones de la invención será expresado
 generalmente en términos de la cantidad de proteína por dosis. Una dosis de alrededor de 0,9 mg de proteína por ml
 es típica para las vacunas intranasales basadas en OMV [54]. La vacuna basada en OMV MENZB™ contiene entre
 25 y 200 µg de proteína por mililitro, por ejemplo entre 45 y 90 µg/ml, o 50±10 µg/ml. Las composiciones de la
 invención preferiblemente incluyen menos de 100 µg/ml de OMV por cepa de bacteria.

Las composiciones de la invención pueden ser preparadas de varias formas. Por ejemplo, las
 composiciones pueden ser preparadas como inyectables, ya sea soluciones líquidas o suspensiones. La
 composición puede ser preparada para administración pulmonar, por ejemplo como un inhalador, usando un polvo
 fino o un pulverizador. La composición puede ser preparada como un supositorio o pesario. La composición puede
 ser preparada para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como una pulverización, gotas, gel o polvo
 [por ejemplo, refs 57 & 58].

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se envasan en
 formato de dosis múltiples. Los antimicrobianos como el tiomersal y el 2-fenoxietanol se encuentran comúnmente en
 vacunas, pero se prefiere usar o un conservante libre de mercurio o ningún conservante en absoluto.

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

Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo cloruro sódico) para dar
 tonicidad. Es típica una concentración de 10±2 mg/ml de NaCl. La concentración de cloruro sódico es
 preferiblemente mayor de 7,5 mg/ml.

Las composiciones de la invención serán administradas generalmente en conjunción con otros agentes
 inmunoregulatorios. En particular, las composiciones incluirán típicamente uno o más adyuvantes, y la invención
 proporciona un proceso para preparar una composición de la invención, que comprende el paso de mezclar
 vesículas de la invención con un adyuvante, por ejemplo en un portador farmacéuticamente aceptable. Los
 adyuvantes adecuados incluyen, pero no están limitados a:

40 A. Composición que contiene minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención
 incluyen sales minerales, como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales como
 hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo
 ver capítulos 8 & 9 de la ref. 59], o mezclas de diferentes compuestos minerales, con los compuestos tomando
 cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose con adsorción. Las
 composiciones que contienen minerales pueden también ser formuladas como una partícula de una sal metálica
 [60].

Un adyuvante de fosfato de aluminio típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con la proporción molar
 PO₄/Al entre 0,84 y 0,92, incluida en 0,6 mg de Al³⁺/ml. Se puede usar la adsorción con una dosis baja de fosfato de
 aluminio, por ejemplo entre 50 y 100 µg Al³⁺ por conjugado por dosis. Cuando se usa un fosfato de aluminio y se
 desea no adsorber un antígeno en el adyuvante, esto se favorece incluyendo iones de fosfato libres en la solución
 (por ejemplo por el uso de un tampón de fosfato).

La vacuna RIVM se probó con adsorción a o un fosfato de aluminio o un adyuvante de hidróxido de
 aluminio, y se descubrió que el adyuvante de fosfato de aluminio da resultados superiores [55]. Los productos
 MeNZB™, MenBvac™ y VA-MENINGOC-BC™ incluyen todos un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Una dosis típica de adyuvante de aluminio es de alrededor de 3,3 mg/ml (expresada como concentración de
 Al³⁺).

B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsiones de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención

incluyen emulsiones de escualeno-agua, como la MF59 [Capítulo 10 de la ref. 59; ver también ref. 61] (5% Escualeno, 0,5% Tween 80, y 0,5% Span 85, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). También se pueden usar el adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA).

5

C. Formulaciones de Saponina [capítulo 22 de la ref. 59]

Las formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina han sido ampliamente estudiadas como adyuvantes. La saponina también se puede obtener comercialmente de la *Smilax ornata* (zarcaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officianalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, como la QS21, así como formulaciones lípidas, como ISCOMs. La QS21 es comercializada como Stimulon™.

15

Las composiciones de saponina han sido purificadas usando HPLC y RP-HPLC. Las fracciones purificadas específicas usando estas técnicas han sido identificadas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C.. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se describe en la ref. 62. Las formulaciones de saponina pueden también comprender un esterol, como colesterol [63].

20

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden ser usadas para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimuladores (ISCOMs) [capítulo 23 de la ref. 59]. Los ISCOMs incluyen también típicamente un fosfolípido como fosfatidiletanolamina o fosfatilcolina. Se puede usar cualquier saponina conocida en los ISCOMs. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOMs son descritos adicionalmente en las refs. 63-65. Opcionalmente, los ISCOMs pueden estar vacíos de detergente extra [66].

25

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en las refs. 67 & 68.

D. Virosomas y partículas similares a virus.

30

Los virosomas y las partículas similares a virus (VLPs) también pueden ser usadas como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no-patógenos, no-replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas virales nativos. Las proteínas virales pueden ser producidas de forma recombinante o aisladas de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLPs incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (como Ha o NA), virus de la Hepatitis B (como proteínas del núcleo o de la cápsida), virus del sarampión, virus de la hepatitis E, virus Sindbis, rotavirus, virus de Fiebre Aftosa, retrovirus, virus de Norwalk, virus de papiloma humano, VIH, ARN-fagos, Q β -fago (como proteínas de la cubierta), GA-fago, fr-fago, fago AP205, y Ty (como proteína pl de retrotransposón Ty). Las VLPs se tratan adicionalmente en las refs. 69-74 Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, la ref. 75.

35

40

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos como derivados no tóxicos de lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS), derivados de Lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ADP-ribosilantes y derivados desintoxicados de los mismos.

45

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 de-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3 De-O-acilado se describe en la ref. 76. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para ser filtradas de forma estéril a través de una membrana de 0,22 μ m [76]. Otros derivados LPS no tóxicos incluyen imitadores de monofosforil lípido A, como derivados de fosfato de aminoalquilo glucosaminida, por ejemplo RC-529 [77, 78].

50

Los derivados de Lípido A incluyen derivados de lípido A de la *Escherichia coli* como el OM-174. El OM-174 se describe por ejemplo en las refs. 79 & 80.

55

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de oligonucleótidos que contienen un motivo GpC (una secuencia dinucleótida que contiene una citosina no metilada ligada por un fosfato enlazado a una guanósina). ARNs de cadena doble y oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también han mostrado ser inmunoestimuladores.

60

Los CpGs pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos como modificaciones de fósforotioato y pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla. Las referencias 81, 82 y 83 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo reemplazo de la guanósina con 2'-desoxi-7-deazaguanósina. El efecto adyuvante de los

65

oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en las refs. 84-89.

La secuencia de CpG puede ser dirigida a TLR9, como el motivo GTCGTT o TTCGTT [90]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, como un ODN CpG-B. Los ODNs CpG-A y CpG-B se tratan en las refs. 91-93. Preferiblemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG es construido de tal manera que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden ser unidos a sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Ver, por ejemplo, refs. 90 & 94-96.

Las toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y derivados desintoxicados de las mismas se pueden usar como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E.coli* (enterotoxina lábil al calor del *E.coli*), cólera ("CT"), o tosferina ("PT"). El uso de toxinas ADP-ribosilantes desintoxicadas como adyuvantes mucosales se describe en la ref. 97 y como adyuvantes parenterales en la ref. 98. La toxina o toxoide esta preferiblemente en la forma de una holotoxina, que comprende tanto subunidades A como B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferiblemente la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante LT desintoxicado como LT-K63, LT-R72, y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente la LT-K63 y la LT-R72, como adyuvantes se puede encontrar en las refs. 99-106. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en los alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas ADP-ribosilantes enumeradas en la ref. 107, especialmente incorporadas en la presente por referencia en su totalidad.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [108], etc.) [109], interferones (por ejemplo interferón- γ), factor estimulantes de colonias de macrófagos, y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos se pueden usar también como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [110] o mucoadhesivos como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y derivados del mismo se pueden usar también como adyuvantes en la invención [111].

H. Micropartículas

Las micropartículas también pueden ser usadas como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (es decir una partícula de ~100nm a ~150 μ m de diámetro, más preferiblemente de ~200nm a ~30 μ m de diámetro, y más preferiblemente de ~500nm a ~10 μ m de diámetro) formadas de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo un poli(ácido α -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un poliéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(láctido-co-glicólido) siendo preferidos (por ejemplo con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo con un detergente catiónico, como el CTAB).

I. Liposomas (Capítulos 13 & 14 de la ref 59)

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes se describen en las refs. 112-114.

J. Formulaciones de Éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [115]. Dichas formulaciones incluyen además surfactantes de ésteres de sorbitán de polioxietileno en combinación con un octoxinol [116] así como éteres de alquilo de polioxietileno o surfactantes de ésteres en combinación con al menos un surfactante no iónico adicional como un octoxinol [117]. Los éteres de polioxietileno son seleccionados del grupo siguiente: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), polioxietileno-9-esteoril éter, polioxietileno-8-esteoril éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter, y polioxietileno-23-laurilo éter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen por ejemplo, en las refs. 118 y 119.

L. Péptidos de muramilo

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

M. Compuestos de Imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de Imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las refs. 120 y 121.

La invención puede también comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvantes pueden ser usadas en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite-en-agua [122]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) [123]; (3) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL +IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [124]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite-en-agua [125]; (6) SAF, que contiene un 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80™, 5% de polímero de bloque plurónico L121, y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitada vorticialmente para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande. (7) sistema adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene un 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo consistente de monofosforilípido A (MPL), dimicolato trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores se describen en el capítulo 7 de la ref. 59.

El uso de adyuvantes de sales de aluminio se prefiere particularmente, y los antígenos son generalmente adsorbidos a tales sales. Es posible en composiciones de la invención adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio pero para tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. En general, sin embargo, se prefiere usar sólo una única sal, por ejemplo un hidróxido o un fosfato, pero no ambos. No todas las vesículas necesitan ser adsorbidas, es decir algunas o todas pueden estar libres en la solución.

Métodos de tratamiento

La invención también proporciona un método para promover una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al mamífero. La respuesta inmune es preferiblemente protectora y preferiblemente implica anticuerpos. El método puede promover una respuesta de refuerzo en un paciente que ya ha sido sensibilizado contra la *N.meningitidis*. Los regímenes de sensibilización/refuerzo subcutáneos e intranasales para las OMVs se describen en la ref. 126.

El mamífero es preferiblemente un humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferiblemente un niño (por ejemplo un niño pequeño o un bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferiblemente un adulto. Una vacuna destinada a niños también puede ser administrada a adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

La invención también proporciona vesículas de la invención para su uso como un medicamento. El medicamento es preferiblemente capaz de promover una respuesta inmune en un mamífero (es decir es una composición inmunogénica) y es más preferiblemente una vacuna.

La invención también proporciona el uso de vesículas de la invención en la fabricación de un medicamento para promover una respuesta inmune en un mamífero.

La invención también proporciona el uso de vesículas de la invención en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente, en donde el paciente ha sido pre-inmunizado con al menos uno de los siguientes: toxoide de la difteria; toxoide tetánico; antígenos de tosferina acelulares o celulares; un sacárido capsular Hib conjugado; antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; un sacárido capsular conjugado meningocócico; y/o un sacárido capsular neumocócico conjugado.

Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio de seroprotección para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado sobre el que un huésped es considerado seroconvertido contra el antígeno son bien conocidos, y dichos títulos son publicados por organizaciones como la WHO. Preferiblemente más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos son seroconvertidos, más preferiblemente más del 90%, todavía

más preferiblemente más del 93% y más preferiblemente el 96-100%.

Las composiciones de la invención serán administradas generalmente directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir por inyección parenteral (por ejemplo subcutáneamente, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular o al espacio intersticial de un tejido), o por rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o a la parte superior del brazo. La inyección puede ser por una aguja (por ejemplo una aguja hipodérmica), pero se puede usar alternativamente una inyección sin agujas. Una dosis intramuscular típica dosis es de 0,5 ml.

El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden ser usadas en un programa de inmunización primaria y/o en programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede estar seguido por un programa de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre dosis de recuerdo (por ejemplo entre 4-16 semanas), y entre dosis de recuerdo y refuerzo, se puede determinar de forma rutinaria. La vacuna RIVM basada en OVM se probó usando un programa primario de 3- o 4-dosis, con la vacunación a 0, 2 & 8 ó 0, 1, 2 & 8 meses. La MenZB™ se administra como tres dosis en intervalos de seis semanas. Estos programas pueden ser usados de acuerdo con la invención. Las preparaciones de vesículas dadas en cada etapa de dosis pueden ser las mismas o diferentes.

En métodos de la invención, donde una primera dosis se da en el momento cero después una segunda y una tercera dosis se pueden dar durante los siguientes dos meses, y una cuarta dosis se puede dar entre 11 y 13 meses después del momento cero. La primera, segunda y tercera dosis pueden comprender vesículas con el mismo serosubtipo que las otras, y la cuarta dosis puede comprender vesículas con un serosubtipo diferente de las tres primeras dosis. La cuarta dosis puede contener vesículas sólo con un serosubtipo diferente de las primeras tres dosis, o puede contener dos tipos de vesícula, una con un serosubtipo diferente de las primeras tres dosis y una con el mismo subtipo. La primera, segunda y tercera dosis se dan preferiblemente a intervalos de entre 6 y 8 semanas. La cuarta dosis se da preferiblemente alrededor de 1 año después del momento cero. El paciente recibe preferiblemente la misma cantidad de vacuna en cada una de las cuatro dosis.

Como se ha descrito anteriormente, la invención pueden implicar la administración de vesículas de más de un subtipo y/o serosubtipo de *N.meningitidis* [por ejemplo ref. 41], ya sea de forma separada o en mezcla.

La invención puede ser usada para provocar inmunidad sistémica y/o mucosal.

En general, las composiciones de la invención son capaces de inducir respuestas de anticuerpos bactericidas séricas después de ser administradas a un sujeto. Estas respuestas son convenientemente medidas en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [por ejemplo ver nota final 14 de la referencia 27]. La actividad bactericida sérica (SBA) mide la destrucción bacteriana mediada por complemento, y puede ser ensayada usando complemento de cría de ratón o humano. Los estándares WHO requieren una vacuna para inducir al menos un aumento de 4 veces en la SBA en más del 90% de los recipientes. La MeNZB™ provoca un aumento de 4 veces en la SBA 4-6 semanas después de la administración de la tercera dosis.

Componentes antigénicos adicionales

Además de contener vesículas antigénicas de la invención, las composiciones de la invención pueden incluir antígenos no vesiculares adicionales. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- un antígeno sacárido del serogrupo A, C, W135 y/o Y de la *N.meningitidis*, como el oligosacárido descrito en la ref. 127 del serogrupo C o los oligosacáridos de la ref. 128. El producto VA-MENINGOC-BC™ contiene polisacárido del serogrupo C.
- un antígeno sacárido de la *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo refs. 129-131; capítulos 22 & 23 de la ref. 138].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, como antígenos de superficie y/o de núcleo [por ejemplo 133, 134; capítulo 16 de la ref. 138].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo 135].
- un antígeno de la *Bordetella pertussis*, como holotoxina de la tosferina (PT) y hemaglutinina filamentososa (FHA) de *B.pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo refs. 136 & 137; capítulo 21 de la ref. 138].
- un antígeno de difteria, como un toxoide de difteria [por ejemplo capítulo 13 de la ref. 138].
- un antígeno del tétano, como un toxoide del tétano [por ejemplo capítulo 27 de la ref. 138].
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae B* [por ejemplo capítulo 14 de la ref. 138].
- un antígeno de *N.gonorrhoeae* [por ejemplo ref. 139].
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo 140-146].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo 147].

- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo 148].
- antígeno(s) de la polio [por ejemplo 149, 150; capítulo 24 de la ref. 138] como el IPV.
- antígeno(s) de la rabia [por ejemplo 151] como virus inactivados liofilizados [por ejemplo 152, RabAvert™].
- antígenos del sarampión, las paperas y/o la rubéola [por ejemplo capítulos 19, 20 y 26 de la ref. 138].
- antígeno(s) de la gripe [por ejemplo capítulos 17 & 18 de la ref. 138], como proteínas de superficie de neuraminidasa y/o hemaglutinina.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo 153].
- un antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo grupo B) [por ejemplo 154, 155].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo grupo A) [por ejemplo 155, 156, 157].

Cuando se usa un antígeno sacárido o de carbohidrato, está preferiblemente conjugado con un portador para potenciar la inmunogenicidad. La conjugación de antígenos sacáridos neumocócicos, meningocócicos y de *H.influenzae B*, es bien conocida.

Los antígenos de proteína tóxica pueden ser desintoxicados cuando sea necesario (por ejemplo desintoxicación de la toxina de la tosferina por medios químicos y/o genéticos [137]).

Cuando se incluye un antígeno de difteria en la composición se prefiere también incluir un antígeno de tétano y antígenos de tosferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de tétano se prefiere incluir también antígenos de difteria y tosferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de tosferina se prefiere incluir también antígenos de difteria y tétano. Las combinaciones de DTP son por lo tanto preferidas.

Los antígenos sacáridos están preferiblemente en la forma de conjugados. Las proteínas portadoras preferidas para conjugados son toxinas o toxoides bacterianos, como toxoide de difteria o toxoide de tétano. El mutante CRM197 de la toxina de difteria [158-160] es un portador particularmente preferido, ya que es un toxoide de difteria. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* [161], péptidos sintéticos [162,163], proteínas de choque térmico [164,165], proteínas de tosferina [166,167], citoquinas [168], linfoquinas [168], hormonas [168], factores de crecimiento [168], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4⁺ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [169], como N19, proteína D de *H. influenzae* [170,171], proteína de superficie neumocócica PspA [172], neumolisina [173], proteínas de captación de hierro [174], toxina A o B de *C.difficile* [175], etc.

Es también posible añadir vesículas que no sean vesículas de la invención, por ejemplo OMVs, MVs, NOMVs, etc. que son preparadas por métodos distintos a los de la invención (por ejemplo preparadas por métodos que implican la interrupción de membranas bacterianas, como se describe en el estado de la técnica).

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

Como una alternativa a usar antígenos de proteína en la composición de la invención, se puede usar ácido nucleico que codifica el antígeno. Los componentes de proteína de las composiciones de la invención pueden por lo tanto ser reemplazados por ácido nucleico (preferiblemente ADN, por ejemplo en la forma de un plásmido) que codifica la proteína.

General

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X+Y.

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

El vocablo "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el vocablo "sustancialmente" puede ser omitido de la definición de la invención.

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo comparando las dos secuencias. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia puede ser determinado usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 176. Un alineamiento preferido se determina por el algoritmo de búsqueda de homologías Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homologías Smith-Waterman es bien conocido y se describe en la referencia 177.

Los términos 'GNA33', 'NMB0033' y 'MLTA' pueden ser usados intercambiamente cuando se hace referencia a meningococos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

5 La Figura 1 muestra las salidas de filtración de gel con proteínas estándar (inferior) y con el sedimento de centrifugación (superior) del sobrenadante del cultivo de la cepa $\Delta mltA$. El eje y muestra la absorbancia a 280nm.

10 La Figura 2 muestra microscopía electrónica de vesículas de la invención.

15 La Figura 3 muestra análisis western blot de vesículas de la invención. Se usaron seis anticuerpos diferentes (A-F) para teñir los blots: A=suero de ratón promovido contra OMVs preparadas de la cepa NZ por extracción de desoxicolato; B=suero de ratón promovido contra mutantes bloqueados $\Delta GNA33$; C=anti-Por_{AP1,4} monoclonal de ratón; D= suero anti-NMB2132 de ratón; E=suero anti-NMB1030 de ratón; F=suero anti-NMB de ratón.

La Figura 4 muestra un PAGE en 2D de vesículas de la invención.

20 La Figura 5 compara las proteínas liberadas en sobrenadantes del cultivo por bacterias del tipo salvaje o $\Delta GNA33$. Pista 2: marcadores de peso molecular; Pista 3; control del medio de cultivo; pista 3: 20 μ g de proteínas recogidos por centrifugación a alta velocidad de medio de cultivo $\Delta GNA33$ a $OD_{620nm}=0,5$, correspondiente a 6,5 ml de medio de cultivo; pista 4: proteínas recogidas por centrifugación a alta velocidad de 6,5 ml de medio de cultivo MC58 del tipo salvaje a $OD_{620nm}=0,5$.

25 La Figura 6 muestra SDS-PAGE de un extracto total de MC58 de tipo salvaje (pistas 2 y 4) y de vesículas liberadas por mutante bloqueado $\Delta GNA33$ (pistas 3 y 5). Las pistas 2 y 3 son proteínas no desnaturalizadas a 95° C antes del SDS-PAGE; las pistas 4 y 5 fueron desnaturalizadas a 95° C.

30 Las Figuras 7 y 8 muestran SDS-PAGE en 1D y 2D de vesículas preparadas de la cepa 394/98. En la Figura 8, el eje horizontal va de pl 3 a 10 y el eje vertical va de 10 a 200 kDa.

Las Figuras 9 y 10 muestran SDS-PAGE en 1D de vesículas preparadas de cepas bloqueadas *tolR* ExPEC.

35 Las Figuras 11 a 13 muestran SDS-PAGE en 1D y 2D de vesículas de meningococos bloqueados de $\Delta mltA$.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Preparación de cepa bloqueada de $\Delta mltA$ meningocócica

40 Se preparó una cepa meningocócica en la que el gen *mltA* es reemplazado por un intercambio alélico con un casete antibiótico.

45 La cepa de *N.meningitidis* MC58 se transformó con plásmido pBSUDGNA33ERM. Este plásmido contiene regiones de flanqueo secuencia abajo y secuencia arriba para el intercambio alélico, un gen *mltA* truncado, y el gen *ermC* (codificando la resistencia a la eritromicina). La región de flanqueo secuencia arriba (incluyendo el codón de inicio) desde la posición -867 a la +75 y la región de flanqueo secuencia abajo (incluyendo el codón de parada) desde la posición +1268 a la +1744 se amplificaron de MC58 usando los cebadores U33FOR, U33REV, D33FOR y D33REV [25]. Los fragmentos fueron clonados en pBluescript™ y transformados en DH% de *E.coli* usando técnicas estándar. Una vez que toda la subclonación fue completada la cepa MC58 de *Neisseria* naturalmente competente se transformó seleccionando una pocas colonias cultivadas durante la noche en placas de agar GC y mezclándolas con 20 μ l 10 mM Tris-HCL (pH 6,5) que contenía 1 μ g de ADN plásmido. LA mezcla fue localizada en un placa de agar de chocolate, incubada durante 6 horas a 37° C con un 5% de CO₂, y después diluida en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y esparcida en placas de agar GC que contenían 7 μ g/ml de eritromicina. El intercambio alélico con el gen *mltA* cromosómico se verificó por PCR, y la carencia de expresión del MltA se confirmó por análisis Western blot.

60 Como se informa en la referencia 25, la cepa bloqueada $\Delta mltA$ no tienen la organización topológica correcta de la membrana celular, tiene separación celular anormal, morfología celular anormal, septos no divididos, septos dobles, agrupación de células, intercambio de membranas externas y virulencia reducida. La referencia 25 también informa que la cepa bloqueada libera varias proteínas de membrana en el sobrenadante del cultivo, incluyendo la PorA, PIB, proteínas de membrana externa clase 4 y clase 5.

65 También se hizo un bloqueo de $\Delta mltA$ de la cepa de Nueva Zelanda 394/98 (lin3; B:4:P1.4) que es la cepa de la que el producto MeNZB™ se produce.

Análisis de proteínas liberadas

5 La cepa $\Delta mltA$ se cultivó en medio de cultivo GC en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ hasta OD_{600nm} 0,5. Las bacterias se recogieron durante 10 minutos de centrifugación a 3500 x g. El sobrenadante, (es decir, el medio de cultivo) se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 μ m (Millipore), y el filtrado libre de células se sometió a centrifugación a alta velocidad (200.000 x g, 90 min). Esta centrifugación resultó en la formación de un sedimento, con alrededor de 8-12 mg de proteína por litro de medio de cultivo. No se vio dicho sedimento si las bacterias MC58 de tipo salvaje se trataron de la misma manera, y por lo tanto la formación de sedimento es un resultado del bloqueo de $\Delta mltA$. El sedimento se lavó dos veces con PBS (centrifugación 200.000 x g, 30 min) para análisis adicional.

15 En un primer análisis, el material del sedimento se re-suspendió en PBS y se aplicó a columna de filtración en gel Superdex 200 PC3.2/30, ejecutada en un sistema SMART (Amersham Biosciences) que había sido equilibrado en PBS. El caudal fue de 40 μ l/min, y el eluido fue monitorizado a 280 nm. La columna fue calibrada con 20 μ g de dextrano Bleu (2.000 kDa), 10 μ de ferritina (440 kDa), 140 μ g de albúmina de suero bovino (65 kDa) y 200 μ g de ribonucleasa A (15 kDa). Como se muestra en la Figura 1, la mayoría de las proteínas eluidas en un pico principal correspondiente a un peso molecular sustancialmente más alto de 2.000 kDa. Este resultado sugiere que las varias proteínas están asociadas.

20 En un segundo análisis, el material presente en el pico de peso molecular alto se sometió a microscopía electrónica de tinción negativa. Este análisis reveló la presencia de vesículas de membrana bien organizadas con un diámetro de alrededor de 50-100 nm (Figura 2).

25 Estos experimentos sugieren que la delección del gen *mltA* perturba el montaje normal de la membrana bacteriana, y que esto resulta en la liberación espontánea en el sobrenadante del cultivo de estructuras de membrana que se reúnen en vesículas esféricas, homogéneas.

30 La Figura 5 muestra análisis SDS-PAGE de medio de cultivo después del desarrollo de bacterias Δ GNA33 o del tipo salvaje, y muestra las diferentes características de liberación de proteína.

Análisis de vesículas

35 Las vesículas derivadas de $\Delta mltA$ se compararon con vesículas meningocócicas preparadas por el método de extracción con detergente 'normal'.

40 Las cepas meningocócicas MC58, NZ394/98 y NZ98/254, y sus mutantes $\Delta mltA$ isogénicos respectivos, se cultivaron en 20 ml o 200 ml de medio de cultivo GC en atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ hasta OD_{620nm} 0,5. Las bacterias se recogieron durante 10 minutos de centrifugación a 3500g. Las vesículas ('DOMVs') se prepararon de las bacterias del tipo salvaje por extracción con detergente como se describe en la referencia 178. Las vesículas de la invención ('mOMVs') se prepararon de cepas bloqueadas por filtración a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 μ m, seguido por centrifugación a alta velocidad (200.000g, 90 min) de los filtrados, el lavado de los sedimentos que contenían vesículas (centrifugación 200.000g, 30 min) dos veces con solución salina tampón de fosfato, (PBS), y después con re-suspensión con PBS.

45 Tanto las mOMVS como las DOMVS se analizaron mediante electroforesis monodimensional de desnaturalización. Brevemente, se resolvieron 20 μ g de proteínas de vesícula por SDS-PAGE y se visualizaron por tinción con Azul de Coomassie de 12,5% de geles. Las condiciones de desnaturalización (2% de SDS) y semi-desnaturalización (0,2 % de SDS, sin ditiotretitol, sin calentamiento) fueron usadas electroforesis monodimensional. La cantidad de proteína (20 μ g) se determinó por ensayo de proteínas DC (BioRad), usando albúmina de suero bovino como una proteína estándar.

50 Las vesículas fueron desnaturalizadas durante 3 minutos a 95°C en un tampón de muestra SDS-PAGE que contenía un 2% de SDS. Se cargaron entonces 20 μ g de proteína en 12,5% de geles de acrilamida, que fueron teñidas con Azul de Coomassie R-250. Se realizó también electroforesis 2-dimensional en 200 μ g de proteína llevada a un volumen final de 125 μ l con tampón de re-hinchazón que contenía 7M de urea, 2M de tiourea, 2% (p/v) (3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano-sulfonato), 65 mM de ditiotretitol, 2% (p/v) de amidosulfobetaina-14, 2 mM de tributilfosfina, 20 mM de Tris, y 2% (v/v) de anfólito portador. Las proteínas fueron adsorbidas durante la noche en Immobiline DryStrips (7 cm; gradiente de pH 3-10 no lineal). Las proteínas fueron después 2D-separadas. La primera dimensión se ejecutó usando una Unidad de Enfoque Isoeléctrica IPGphor, aplicando secuencialmente 150 V durante 35 min., 500 V durante 35 min., 1.000 V durante 30 min., 2.600 V durante 10 min., 3.500 V durante 15 min., 4.200 V durante 15 min., y finalmente 5.000 V para alcanzar 12kVh. Para la segunda dimensión, las tiras se equilibraron y las proteínas se separaron en geles 9-16,5% de poliacrilamida lineales (1,5-mm de grosor, 4 x 7x cm). Los geles fueron teñidos de nuevo con Azul Brillante de Coomassie G-250. Se podían ver 266 puntos de proteínas después de la tinción con Azul de Coomassie Coloidal (Figura 4).

65

Los geles 1D y 2D fueron entonces sometidos a digestión de proteínas en gel y preparación de muestras para análisis por espectrometría de masas. Los puntos de proteína fueron extirpados de los geles, lavados con 100 nM de bicarbonato/acetronitrilo de amonio 50/50 (V/V), y secados usando una centrifugadora SpeedVac. Los puntos secados se digirieron 2 horas a 37° C en 12 µl de 0,012 µg/µl de tripsina de grado de secuenciación (Promega) en 50 mM de bicarbonato de amonio, 5 mM. Después de la digestión, se añadieron 5 µl de 0,1% de ácido trifluoroacético, y los péptidos fueron desalados y concentrados con ZIP-TIPs (C18, Millipore). La muestra fue eluida con 2 µl de 5 g/l de ácido 2,5-dihisroibenzoico en 50% de acetronitrilo/0,1% de ácido trifluoroacético en el espectrómetro de masas Anchorchip 384 (400 µm, Bruker, Bremen, Alemania) y se permitió que se secase al aire a temperatura ambiente. Los espectros MALDI-TOF se adquirieron en un Bruker Biflex III MALDI-TOF equipado con un laser de N₂ de 337 nm y un conjunto de fuente de iones multiprobe SCOUT 384 en un modo de reflector ion positivo. Los voltajes de aceleración y el reflector se establecieron a 19 kV y 20 kV, respectivamente. Típicamente, cada espectro se determinó promediando 100 disparos de laser. Los espectros fueron calibrados externamente usando una combinación de cuatro péptidos estándar, angiotensina II (1.046,54 Da), sustancia P (1.347,74 Da), Bombensina (1.619,82 Da) y ACTH18-39 Clip humana (2.465,20 Da), visualizados en la posición adyacente de las muestras. La identificación de proteínas se realizó por tanto comparación automática como manual de valores monoisotópicos generados experimentalmente de péptidos en el intervalo de masas de 700-3000 Da con huellas generadas por ordenador usando el software Mascot.

Los resultados del mutante $\Delta mltA$ MC58 se muestran en la Figura 11. DE las 20 bandas extirpadas sólo en el gel 1D, se identificaron 25 proteínas únicas, 24 (96%) de las cuales se prevé que sean proteínas de membrana externa por el algoritmo PSORT (Tabla 1 de la WO2006/046143). 170 puntos de proteínas en el gel 2D, correspondientes a 51 proteínas únicas, fueron identificados sin ambigüedad por MALDI-TOD (Tabla 1 de la WO2006/046143). 44 de 51 proteínas identificadas se han asignado al compartimiento de la membrana externa por anotación de genoma [Error! Bookmark not defined.]. Las 7 proteínas restantes fueron analizadas para posibles errores en la anotación original. Cuatro proteínas (las proteínas hipotéticas NMB1870, NMB0928 y NMB0109, y la glutamiltanspeptidasa NMB1057) podrían ser clasificadas como proteínas de la membrana externa usando diferentes codones de inicio de los de la ref. Error! Bookmark not defined. por ejemplo para la NMB 1870, usando el codón de inicio asignado en la referencia 179.

Los experimentos de electroforesis 1d y 2D combinados identificaron un total de 65 proteínas en las vesículas derivadas del mutante $\Delta mltA$ MC58. De estas, 6 proteínas fueron identificadas tanto en el gel 1D como en el 2D, mientras que 14 y 45 eran específicas para los geles 1D y 2D, respectivamente (Tabla 1 de la WO2006/046143). Además, 61 de las 65 proteínas identificadas se prevén como proteínas asociadas a la membrana por los algoritmos actuales, indicando que las vesículas de $\Delta mltA$ mOMVs) están mayormente, y posiblemente exclusivamente, constituidas por proteínas de membrana.

EL bloqueo $\Delta mltA$ de la cepa NZ394/98 fue sometido de manera similar a SDS-PAGE 1D y 2D (Figuras 7 y 8). La Tabla 2 de la WO2006/046143 muestra 66 proteínas que fueron identificadas en uno o ambos de los geles, junto con la localización prevista de las proteínas. De nuevo, la mayoría de las proteínas fueron previstas como asociadas a la membrana. Las 47 proteínas comunes a las Tablas 1 y 2 de la WO2006/046143 se muestran en la Tabla 3 de la WO2006/046143.

Los resultados del mutante $\Delta mltA$ de la NZ98/254 se muestran en la Figura 12. Se identificaron 66 proteínas de estos dos geles, 57 de las cuales fueron asignadas al compartimiento de la membrana externa. De nuevo, por lo tanto, las mOMVs están altamente enriquecidas en las proteínas de la membrana externa. 46 de las 57 proteínas habían sido también identificadas en las mOMVs derivadas de la MC58.

Para comparación, la Figura 13 muestra los resultados de DOMVs de la NZ98/254. El análisis proteómico reveló 138 proteínas, sólo 44 de las cuales fueron asignadas al compartimiento de la membrana externa. Las 94 proteínas restantes pertenecían a los compartimientos citoplasmático y de la membrana interna. De estas 44 proteínas de membrana, 32 fueron encontradas también en las 57 proteínas de la membrana externa encontradas en las mOMVs de la cepa isogénica.

Mientras las mOMVs están constituidas en gran parte por proteínas de la membrana externa, por lo tanto, alrededor del 70% de las proteínas de DOMV son o citoplasmáticas o proteínas de la membrana interna. Las DOMVs difieren de las mOMVs no solo en la proporción de proteínas citoplasmáticas sino también por el perfil diferente de sus proteínas de la membrana externa. De las 44 proteínas de la membrana externa vistas en DOMVs, sólo 32 se vieron también en mOMVs.

19 proteínas vistas en mOMVs de tanto la MC58 como la NZ98/254, pero no en las DOMVs de la NZ98/254, se enumeran en la Tabla 4 de la WO2006/046143.

Se preparó un extracto celular total de bacterias como sigue: Las células bacterianas se lavaron con PBS, y el sedimento bacteriano se resuspendió en 80 ml de 50 mM de Tris HCL pH7,3 que contenía cóctel inhibidor de

5 proteasa (Roche Diagnostic). Se añadieron 2 mM de EDTA y 2000 unidades de benzonasa (Merck), las células fueron interrumpidas a 4° C con Disruptor Celular Modelo Basic Z 0.75V equipado con una "cabeza de un disparo" (Constant System Ltd) por 2 ciclos, y las células no interrumpidas fueron retiradas por centrifugación 10 min a 8000 x g a 4° C. Este extracto se analizó por SDS-PAGE, para comparación con un extracto de proteína de las vesículas producidas por las bacterias de ΔGNA33. Como se muestra en la Figura 6, las porinas PorA y PorB (identidades verificadas por secuenciación MALDI-TOF) se ven en la membrana externa bacteriana del tipo salvaje (pistas 2 y 4) y también en las vesículas del mutante bloqueado ΔGNA33 (pistas 3 y 5). Además, estas proteínas son retenidas como trímeros estables en las vesículas que no disocian en monómeros en el tampón de muestra de SDS-PAGE con una concentración baja de SDS (0,2%) bajo condiciones seminativas (sin calentamiento antes de la elctroforesis; pistas 2 y 3), pero que se desnaturalizan a 95° C (pistas 4 y 5).

10 Los niveles de LPS en OMVs extraídas con detergente son típicamente del 5-8% por peso, en relación a la proteína [180]. Cuando se probaron con el ensayo Limulus, el contenido de endotoxina de las vesículas fue de alrededor de dos veces tan alto como el encontrado en las OMVs extraídas con detergente.

15 Finalmente, se evaluó la producción de vesículas en un cultivo en desarrollo. Se descubrió que hasta 20 mg de proteínas asociadas a OMV podían ser recuperadas por gramo de células (peso húmedo) en sobrenadantes del cultivo de cultivos creciendo exponencialmente (OD_{620nm}=0,5).

20 **Immunogenicidad de las Vesículas**

25 Como las vesículas derivadas de ΔmltA están altamente enriquecidas en proteínas de la membrana externa, se investigó su capacidad para obtener anticuerpos bactericidas capaces de matar un panel amplio de aislados clínicos de MenC .

30 La cepa elegida para la prueba fue la 394/98. Esta cepa se eligió debido a que es la cepa de la que se prepara la vacuna basada en OMV MenZB™, ayudando de esta manera a una comparación directa de vesículas ΔmltA de la invención con OMVs preparadas de la cepa del tipo salvaje por métodos del estado de la técnica típicos.

35 Se adsorbieron 10 µg de cada tipo de vesícula a un adyuvante de hidróxido de aluminio (3mg/ml) y se inyectaron en ratones hembra CD1 de 5 semanas de edad (5-10 ratones por grupo).. Las vesículas se dieron intraperitonealmente en los días 0 y 21. Las muestras de sangre para el análisis se tomaron en el día 34, y se probaron para SBA contra 15 cepas del serogrupo B diferentes correspondientes a 11 sub-tipos diferentes, incluyendo los cuatro linajes hipervirulentos principales, usando suero de conejo bebé agrupado como la fuente de complemento. Los títulos bactericidas séricos se definieron como la dilución de suero resultante en una disminución del 50% en las unidades formadoras de colonias (CFU) por ml después de 60 minutos de incubación de bacterias con mezcla de reacción, en comparación con las CFU de control por ml en el momento 0. Típicamente, las bacterias incubadas con el anticuerpo del control negativo en presencia de complemento mostraron un aumento del 150 al 200% en la CFU/ml durante los 60 minutos de incubación. Los títulos fueron como sigue, expresados como el recíproco de la dilución sérica produciendo ≥50% de la muerte bacteriana:

		título BCA	
	Serogrupo:Tipo:Subtipo	mOMVs	DOMVs
45	B:4:P1.4	>8192	>32768
	B:15:P1.7,4	>65536	32768
	B:4,7:P1.7,4	>32768	>32768
50	B:14:P1.4	>32768	>65536
	B:4:P1.7,4	>32768	8192
	B:4,:P1.4	>8192	>8192
	B:14:P1.13	16384	512
55	B:4,7:P1.7,13	>8192	128
	B:4:P1.15	>8192	128
	B:21:P1.9	>8192	<16
	B:2b:P1.10	1024	<16
60	B:4,7:P1.19,15	1024	<16
	B:2b:P1.5,2	1024	<16
	B:2a:P1.2	<16	<16
65	B:NT:P1.3	<16	<16

Los resultados muestran que el suero de las vesículas derivadas de $\Delta mltA$ fueron al menos tan efectivos bactericidamente, y habitualmente mejores que , las OMVs preparadas por extracción química, excepto para la cepa homóloga. Las vesículas de la invención por lo tanto dan mejor reactividad cruzada entre cepas que las OMVs típicas. Además, tomando una dilución 1:1024 como el umbral para la eficacia bactericida, las vesículas de la invención fueron efectivas contra el 87% de las cepas, mientras que las OMVs artificiales fueron sólo efectivas al 40%.

Por lo tanto las mOMVs son mejores que las DOMVs para provocar muerte de anticuerpos dependiente del complemento cuando se prueban sobre un panel de 15 cepas del serogrupo B diferentes. Los sueros de ratón anti-mOMV mostraron actividades bactericidas altas contra la cepa homóloga y contra 14 cepas adicionales, incluyendo 10 subtipos de PorA diferentes. Por el contrario, los sueros de ratón promovidos contra DOMVs muestran títulos bactericidas altos solo contra seis cepas de MenB, que pertenecen a dos subtipos de PorA. Estos resultados indican que la protección de sueros anti-mOMV no fue sólo debida a la obtención de anticuerpos bactericidas contra PorA, que es una de las proteínas de membrana externa más abundantes y el inductor más potente de anticuerpos bactericidas, sino también a otros antígenos bactericidas que en las mOMVs están presentes en cantidades más altas que en las DOMVs.

Western blot

Para confirmar que las vesículas derivadas de $\Delta mltA$ contienen antígenos protectores conservados, se ejecutaron en un SDS-PAGE, se transfirieron a un filtro PDF y se inmunotransfirieron usando anti-sueros específicos contra seis antígenos de proteínas que mostraron previamente ser protectores y estar altamente conservados, incluyendo '287', '953', '741' (GNA1870) y 'NadA'.

Las vesículas se separaron en 10% de geles SDS-PAGE de acrilamida empleando un aparato de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad). Después de la separación de proteínas, los geles fueron equilibrados con 48 mM de Tris-HCl, 30 mM de glicina, pH 9,0, 20% (v/v) de metanol y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) usando una célula de transferencia electroforética semi-seca Trans-Blot™. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con 10% (p/v) leche desnatada en PBS que contenía un 0,2% (p/v) de azida sódica.

Como se muestra en la figura 3, las seis proteínas eran abundantes en las vesículas. Por el contrario, las mismas seis proteínas estaban pobremente representadas en las DOMVs.

En conclusión, las vesículas derivadas de $\Delta mltA$ están predominantemente constituidas por proteínas de la membrana externa, mientras que las DOMVs están fuertemente contaminadas por proteínas citoplasmáticas. Cuando se usan para inmunizar ratones, los sueros promovidos contra las vesículas derivadas de $\Delta mltA$ mostraron una cobertura de cepa más alta y más amplia que las DOMVs.

E. coli patógena extraintestinal

Se preparó una cepa bloqueada de ExPEC CFT073 por delección isogénica del gen *tolR*, reemplazándolo con un marcador de resistencia a kanamicina. La cepa bloqueada se desarrollo a OD_{600nm} 0,4, y el cultivo fue entonces centrifugado. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 μm y el filtrado se precipitó usando TCA. El sedimento fue resuspendido en tampón Tris.

El mismo procedimiento de crecimiento y desarrollo se uso para la cepa madre, sin el bloqueo, y el análisis SDS-PAGE de las dos preparaciones finales se muestra en la Figura 9. La banda de la mano derecha es de la cepa bloqueada y muestra el enriquecimiento de varias bandas de proteínas.

Se prepararon cepas de ExPEC bloqueadas *tolR* adicionales de cepas DH5a, 536 e IHE3034. Las vesículas se prepararon como anteriormente, y el análisis SDS-PAGE de los precipitados de TCA se muestra en la Figura 10.

El mutante bloqueado produce gran cantidad de vesículas, y estas vesículas se sometieron a análisis proteómicos, incluyendo SDS-PAGE 1D y 2D y digestión trípica de proteínas expuestas de superficie en las vesículas seguido por análisis de secuencia de los péptidos liberados.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y se pueden hacer modificaciones mientras se permanece dentro del ámbito y espíritu de la invención

REFERENCIAS

- [1] Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
 [2] de Kleijn et al. (2001) Vaccine 20:352-358.

- [3] Patentes US 5,597,572 & 5,747,653; ver también Patente Europea 0301992.
 [4] Patente Europea 0449958 (concedida de WO90/06696).
 [5] Patente US 5,705,161; see also WO94/08021.
 [6] WO01/91788.
 5 [7] Parmar et al. (1997) *Vaccine* 15:1641-1651.
 [8] WO99/59625.
 [9] WO00/50074.
 [10] Patentes US 5,552,146, 5,981,213 & 5,993,826; see also WO93/03761.
 [11] Zhou et al. (1998) *FEMSMicrobiol Lett* 163:223-228.
 10 [12] Kadurugamuwa & Beveridge (1999) *Microbiology* 145:2051-2060.
 [13] WO97/05899.
 [14] Kesavalu et al. (1992) *Infect. Immun.* 60:1455-1464.
 [15] Blanco et al. (1999) *J Immunol* 163:2741-2746.
 [16] WO01/09350.
 15 [17] Keenan et al. (1998) *FEMS Microbiol Lett* 161:21-27.
 [18] WO00/25811.
 [19] WO01/52885.
 [20] WO98/56901.
 [21] WO02/09746.
 20 [22] WO02/062378.
 [23] WO2004/014417.
 [24] WO2004/019977.
 [25] Adu-Bobie et al. (2004) *Infect Immun* 72:1914-1919.
 [26] Jennings et al. (2002) *Eur J Biochem* 269:3722-3731.
 25 [27] Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820.
 [28] Pollard & Moxon (2002) *Arch Dis Child* 87:13-17.
 [29] WO2004/014417.
 [30] Shockman & Høltje (1994) *Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases*. Pages 131-166 in *Bacterial Cell Wall* (eds. Ghuysen & Hakenbeck).
 30 [31] WO99/10497.
 [32] Steeghs et al. (2001) *The EMBO Journal* 20:6937-6945.
 [33] WO02/07763.
 [34] Patente Europea 0624376.
 [35] van der Ley et al. (1995) *Vaccine* 13:401-7.
 35 [36] WO2004/048404.
 [37] WO 02/062378.
 [38] WO 2004/014417.
 [39] Russo & Johnson (2000) *J Infect Dis* 181:1753-4.
 [40] Bernadac et al. (1998) *J Bacteriol* 180(18):4872-8.
 40 [41] WO02/09643.
 [42] Beveridge (1999) *J Bacteriol* 181:4725-33.
 [43] Moe et al. (2002) *Infect Immun* 70:6021-31.
 [44] Arigita et al. (2003) *Vaccine* 21:950-960.
 [45] WO2004/046177
 45 [46] Patente US 6,180,111.
 [47] WO01/34642.
 [48] Zhu et al. (2000) *J Bacteriol* 182:439-47.
 [49] Moe et al. (2001) *Infect Immun* 69:3762-71.
 [50] Seib et al. (2003) *FEBS Lett* 546:411-5.
 50 [51] WO01/64922
 [52] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN:0683306472.
 [53] RIVM report 124001 004.
 [54] Katial et al. (2002) *Infect Immun* 70:702-7.
 [55] RIVM report 000012 003.
 55 [56] WO03/009869.
 [57] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
 [58] Agarwal & Mishra (1999) *Indian JExp Biol* 37:6-16.
 [59] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 [60] WO00/23105.
 60 [61] WO90/14837.
 [62] Patente US 5,057,540.
 [63] WO96/33739.
 [64] EP-A-0109942.
 [65] WO96/11711.
 65 [66] WO00/07621.

- [67] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [68] Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [69] Niikura et al. (2002) *Virology* 293:273-280.
- 5 [70] Lenz et al. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [71] Pinto et al. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [72] Gerber et al. (2001) *Virology* 75:4752-4760.
- [73] WO03/024480
- [74] WO03/024481
- 10 [75] Gluck et al. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [76] EP-A-0689454.
- [77] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [78] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [79] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [80] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- 15 [81] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [82] WO02/26757.
- [83] WO99/62923.
- [84] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- 20 [85] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [86] WO98/40100.
- [87] Patente US 6,207,646.
- [88] Patente US 6,239,116.
- [89] Patente US 6,429,199.
- 25 [90] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [91] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [92] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [93] WO01/95935.
- [94] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- 30 [95] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [96] WO03/035836.
- [97] WO95/17211.
- [98] WO98/42375.
- [99] Beignon et al. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- 35 [100] Pizza et al. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [101] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [102] Scharton-Kersten et al. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [103] Ryan et al. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [104] Partidos et al. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- 40 [105] Peppoloni et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [106] Pine et al. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [107] Domenighini et al. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [108] WO99/40936.
- [109] WO99/44636.
- 45 [110] Singh et al] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [111] WO99/27960.
- [112] Patente US 6,090,406
- [113] Patente US 5,916,588
- [114] EP-A-0626169.
- 50 [115] WO99/52549.
- [116] WO01/21207.
- [117] WO01/21152.
- [118] Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [119] Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- 55 [120] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [121] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [122] WO99/11241
- [123] WO94/00153.
- [124] WO98/57659.
- 60 [125] Solicitud de patente europeas 0835318, 0735898 and 0761231.
- [126] Bakke et al. (2001) *Infect. Immun.* 69:5010-5015.
- [127] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [128] WO03/007985.
- [129] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- 65 [130] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [131] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.

- [132] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [133] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [134] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- 5 [135] Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [136] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [137] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH*9:232-238.
- [138] *Vaccines* (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
- [139] WO02/079243.
- [140] WO02/02606.
- 10 [141] Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [142] Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- [143] Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- [144] WO99/27105.
- [145] WO00/27994.
- 15 [146] WO00/37494.
- [147] WO99/28475.
- [148] Ross et al. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [149] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [150] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- 20 [151] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
- [152] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
- [153] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [154] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- [155] WO02/34771.
- 25 [156] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [157] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [158] Anonimo (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [159] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [160] Anderson et al. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- 30 [161] EP-A-0372501.
- [162] EP-A-0378881.
- [163] EP-A-0427347.
- [164] WO93/17712
- [165] WO94/03208.
- 35 [166] WO98/58668.
- [167] EP-A-0471177.
- [168] WO91/01146
- [169] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [170] EP-A-0594610.
- 40 [171] WO00/56360.
- [172] WO02/091998.
- [173] Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [174] WO01/72337
- [175] WO00/61761.
- 45 [176] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30.
- [177] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489.
- [178] Fredriksen et al. (1991) *NIPH Ann.* 14:67-79.
- [179] Masignani et al. (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
- [180] Guthrie et al. (2004) *Infect Immun* 72:2528-37.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una bacteria de *Escherichia coli* patógena, que no expresa una proteína del complejo Tol-Pal y/o que tiene una mutación de bloqueo de su gen *mltA*.
2. La *E.coli* de la reivindicación 1, que es una cepa *tolR*.
- 10 3. Una bacteria en el género *Escherichia*, en donde (i) la bacteria tiene una pared celular que incluye peptidoglicano; y (ii) la bacteria no expresa una proteína que tiene una actividad de transglicosilasa lítica de la proteína MltA.
4. La bacteria de la reivindicación 3, que tiene también una mutación de bloqueo de al menos un gen adicional.
5. La bacteria de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, que es una *E.coli* patógena.
- 15 6. La bacteria de la reivindicación 5, en donde la *E.coli* patógena es una bacteria patógena extraintestinal, una bacteria uropatógena o una bacteria asociada a la meningitis/sepsis.
- 20 7. Una composición que comprende vesículas que, durante el cultivo de la bacteria de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, son liberadas en el medio de cultivo.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde la composición no comprende ninguna bacteria viva y/o completa.
- 25 9. Una composición que comprende vesículas, en donde las vesículas están presentes en el filtrado obtenible después de la filtración a través de un filtro de 0,22 µm de un medio de cultivo en el que se ha desarrollado una bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 10. Una vesícula obtenible cultivando la bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. Una composición farmacéutica que comprende vesículas de la reivindicación 10.
12. Un proceso para preparar vesículas bacterianas, que comprende los pasos de: i) cultivar una bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un medio de cultivo de tal forma que la bacteria libere vesículas en el mencionado medio; y (ii) recoger las vesículas de dicho medio.

FIGURA 1

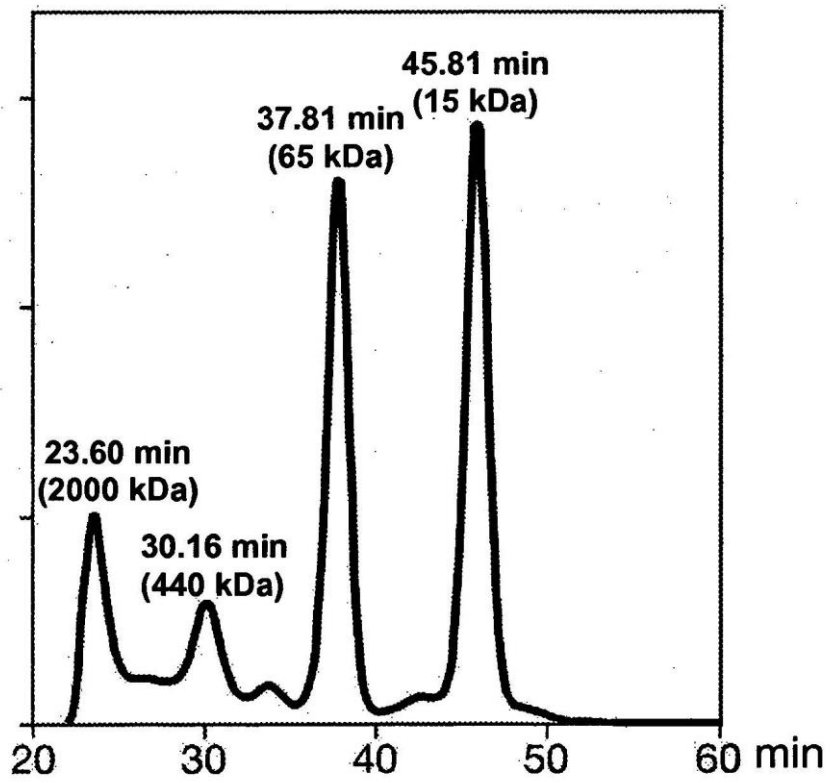
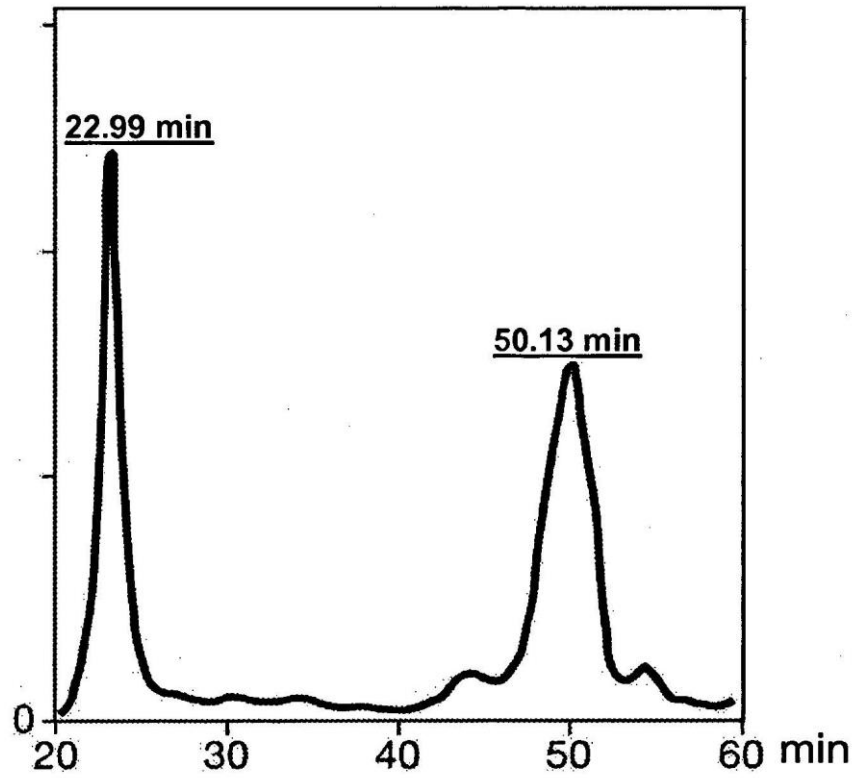


FIGURA 2

FIGURA 2A

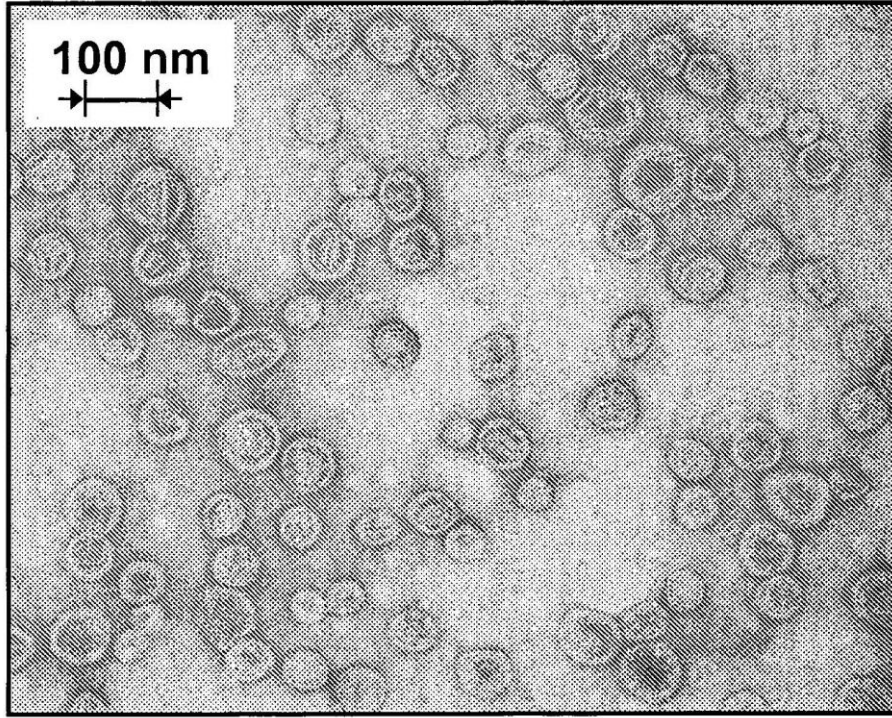


FIGURA 2B

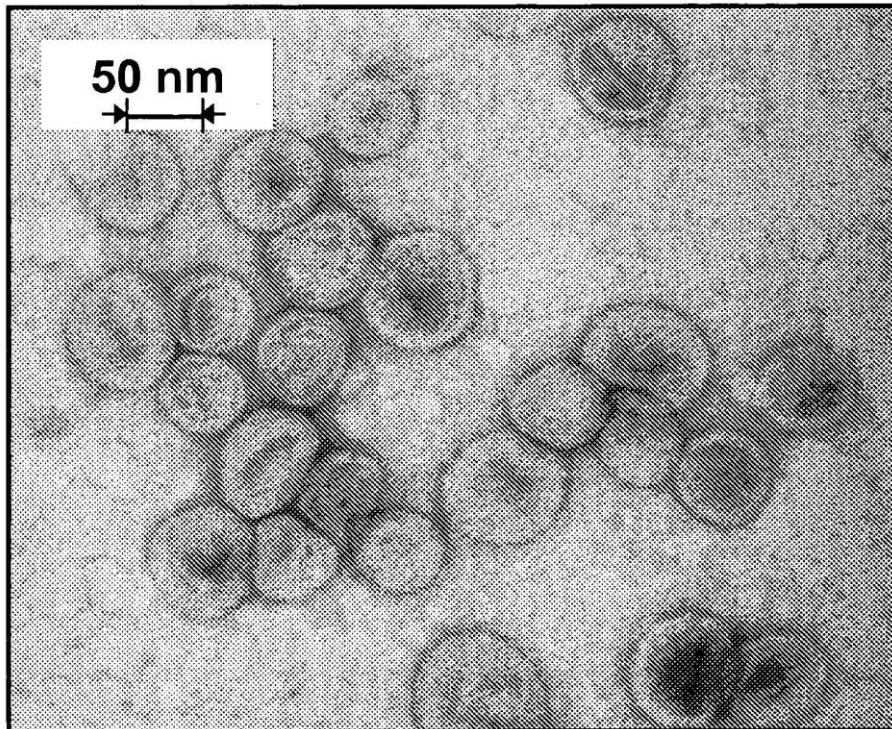


FIGURA 3

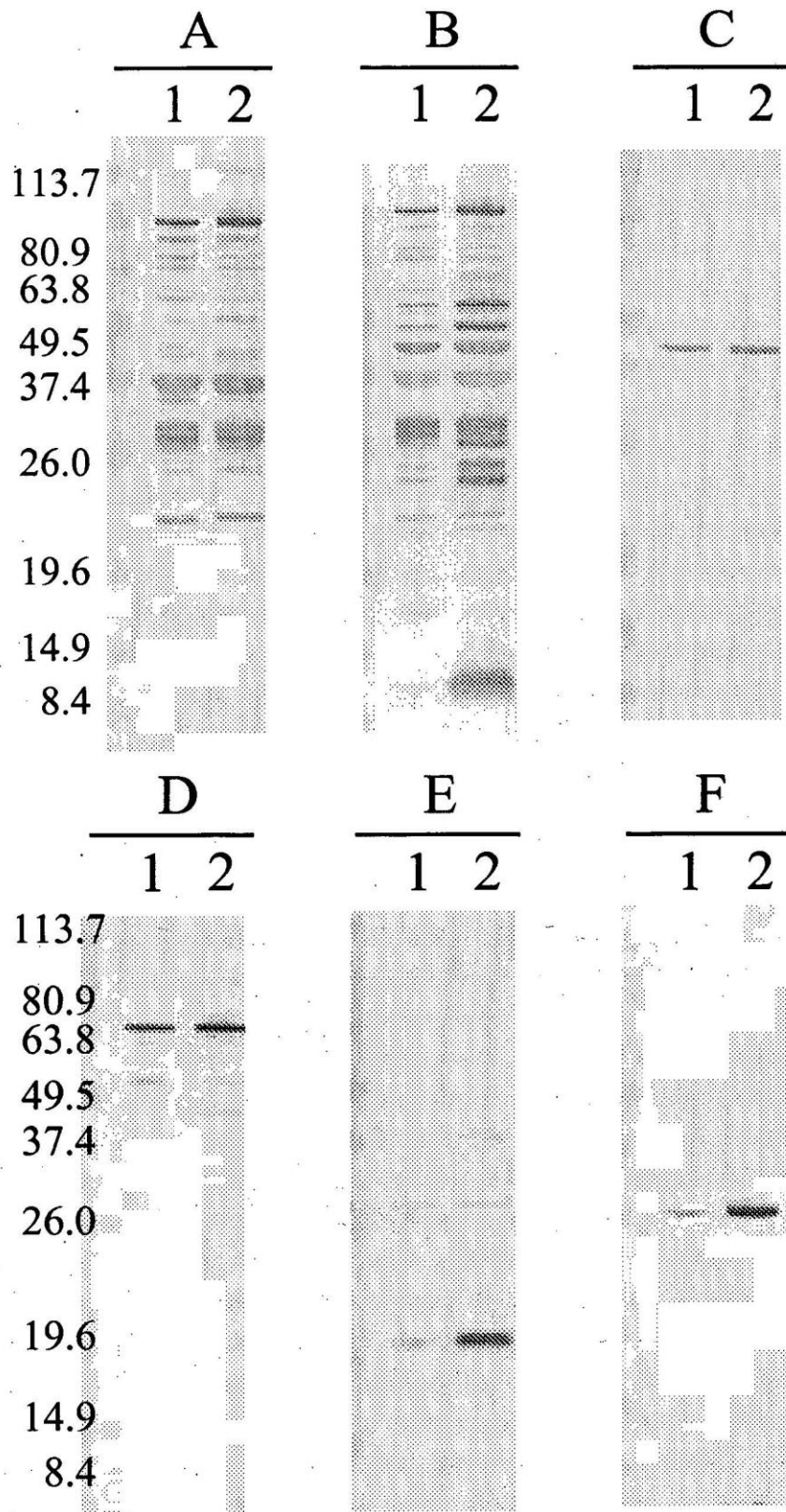


FIGURA 4

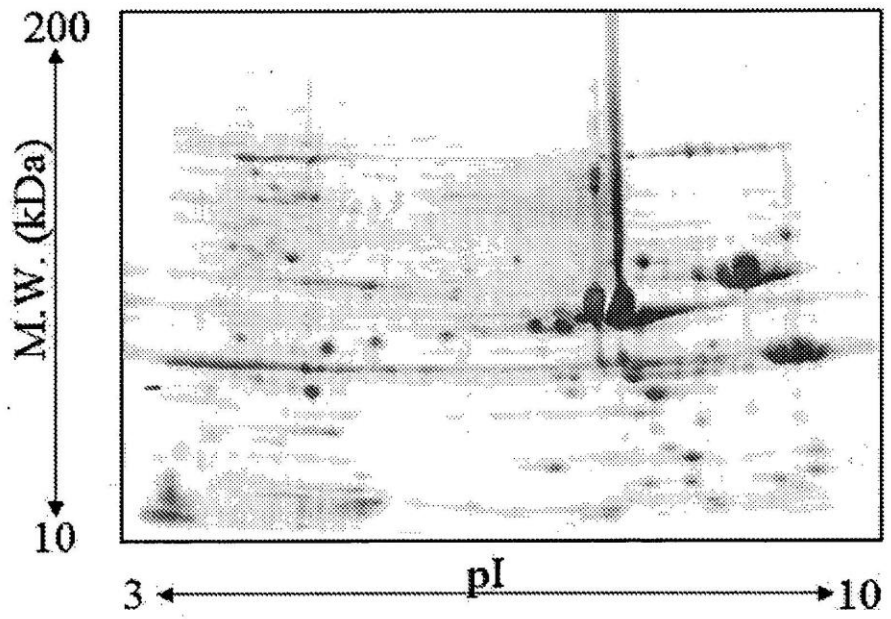


FIGURA 5

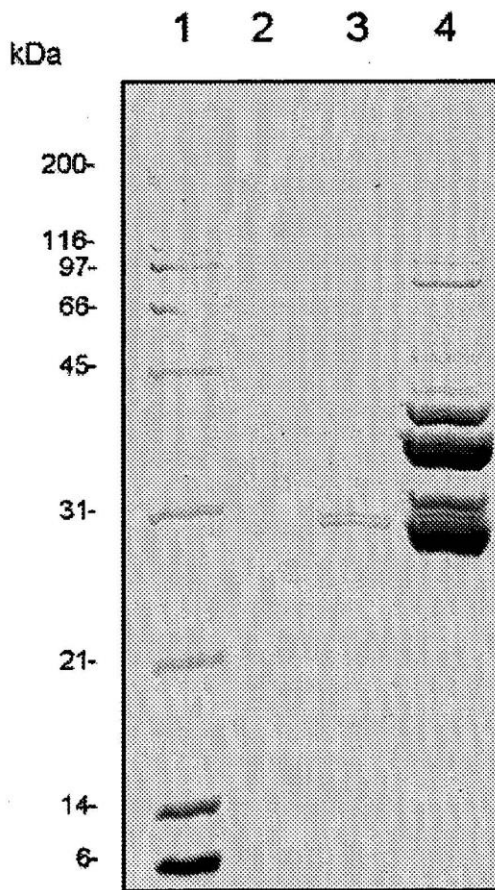


FIGURA 6

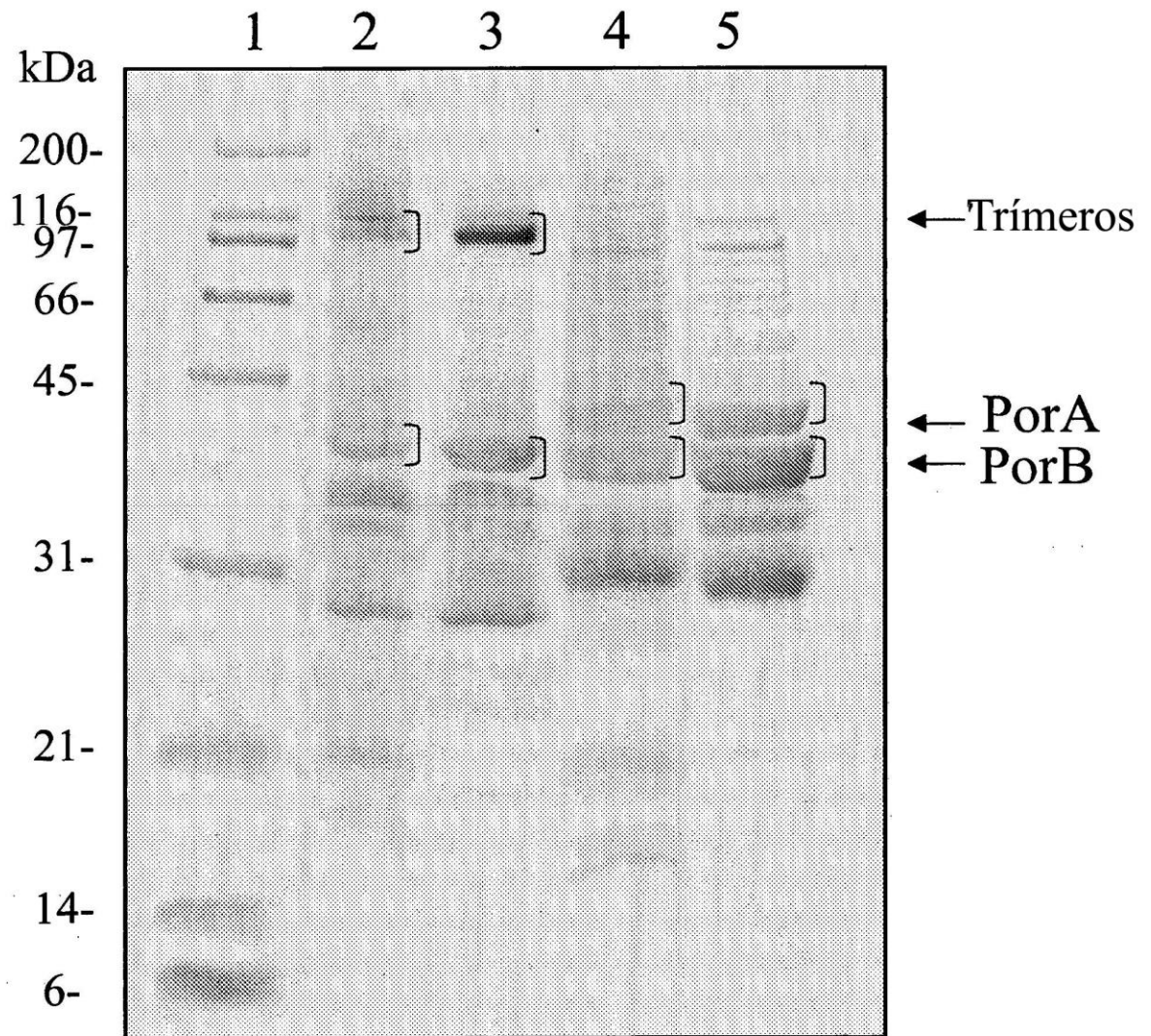


FIGURA 7

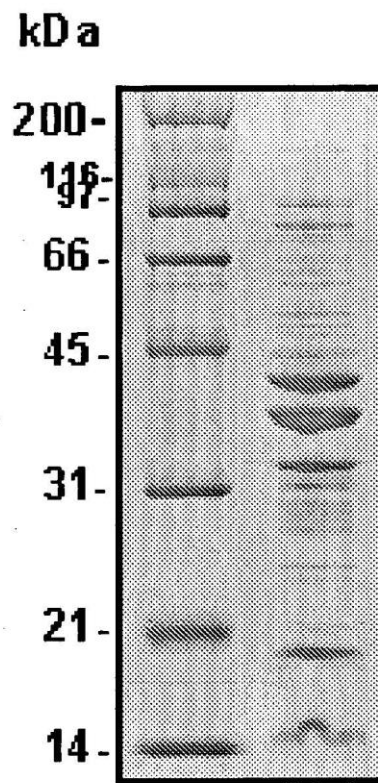


FIGURA 8

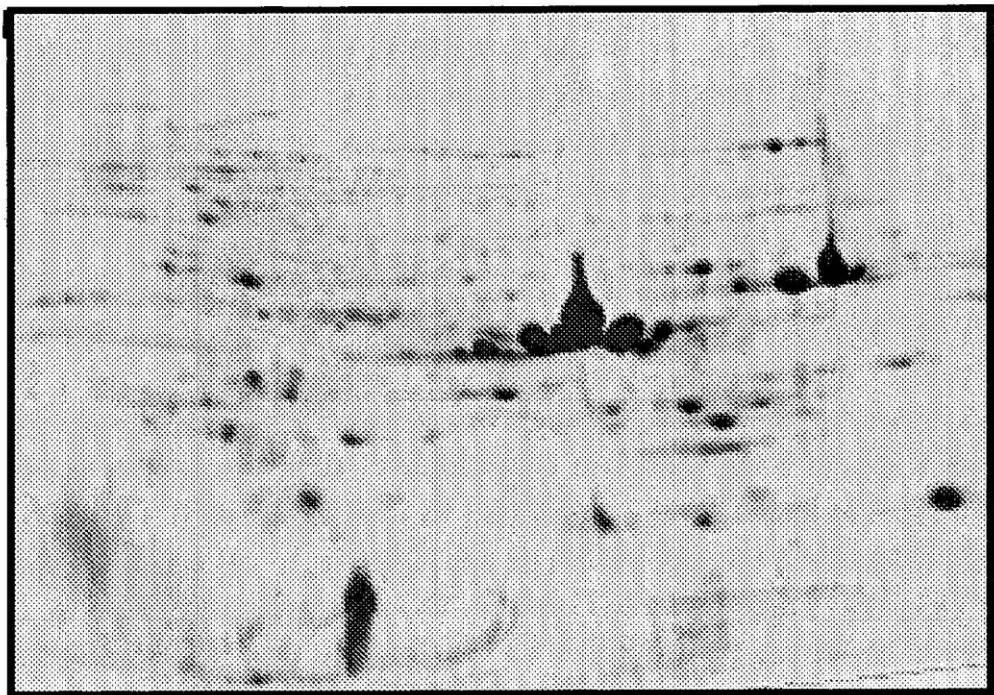


FIGURA 9

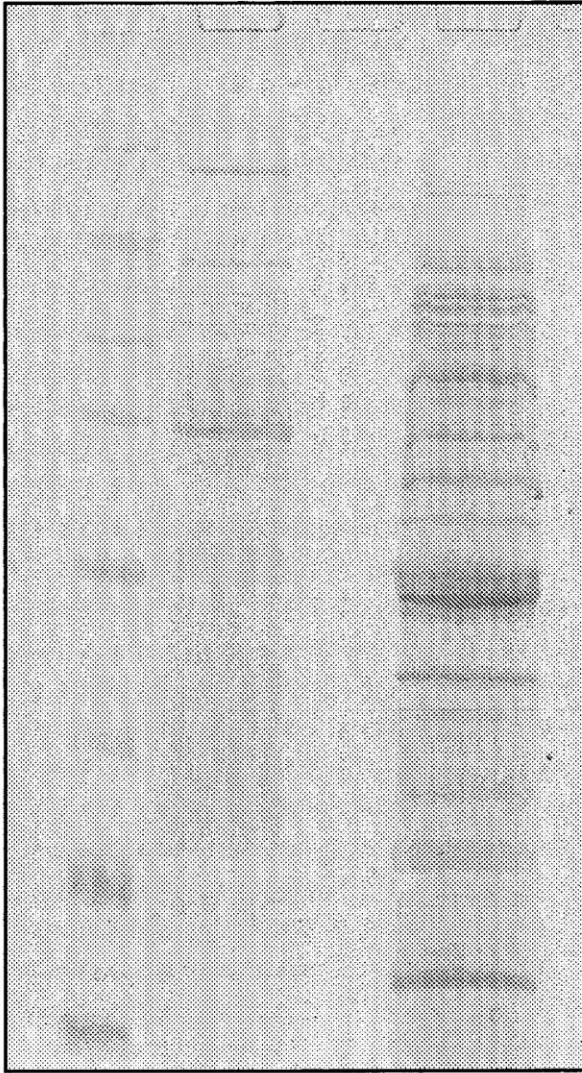


FIGURA 10

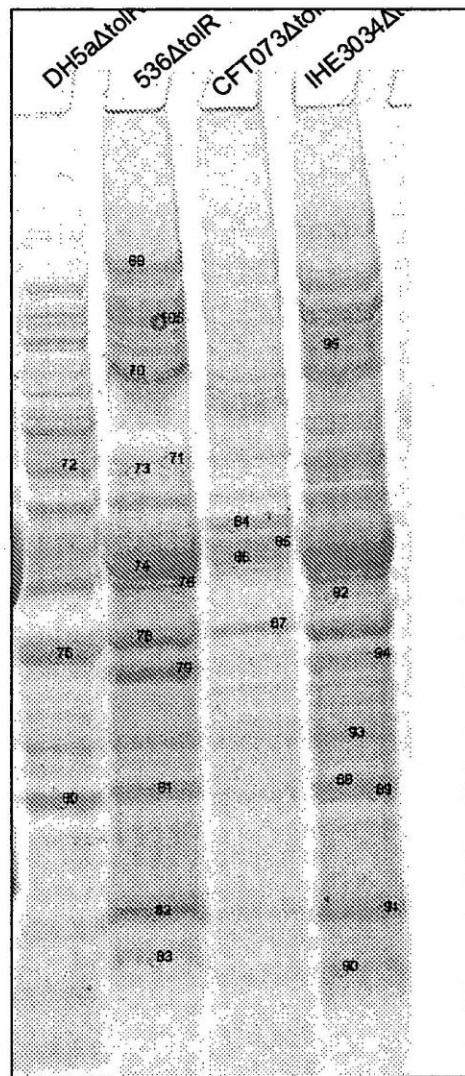


FIGURA 11

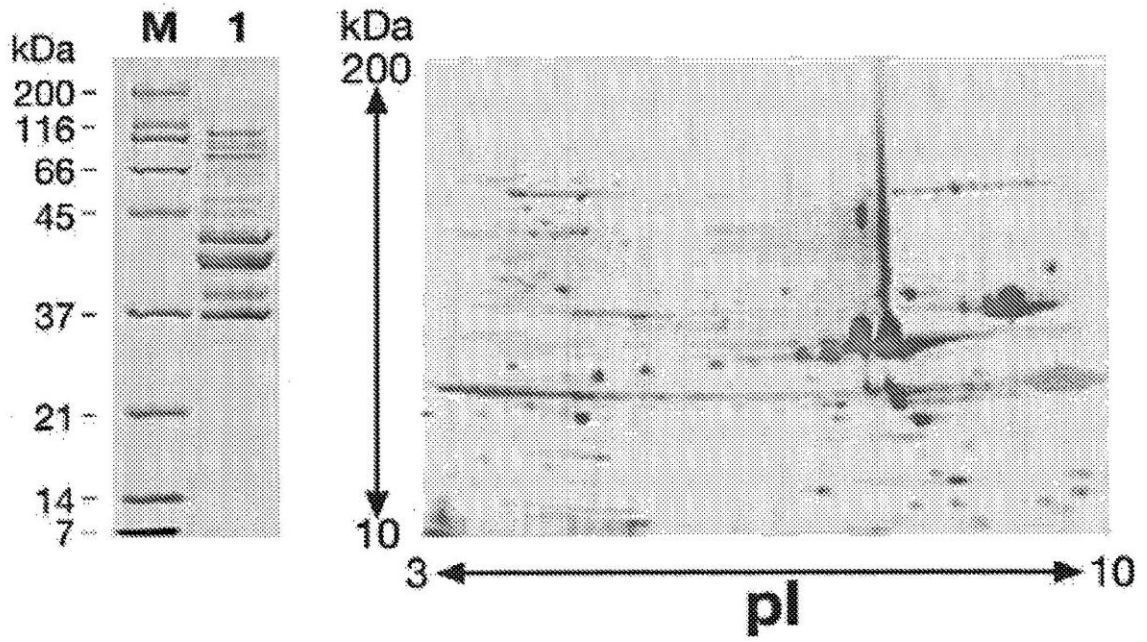


FIGURA 12

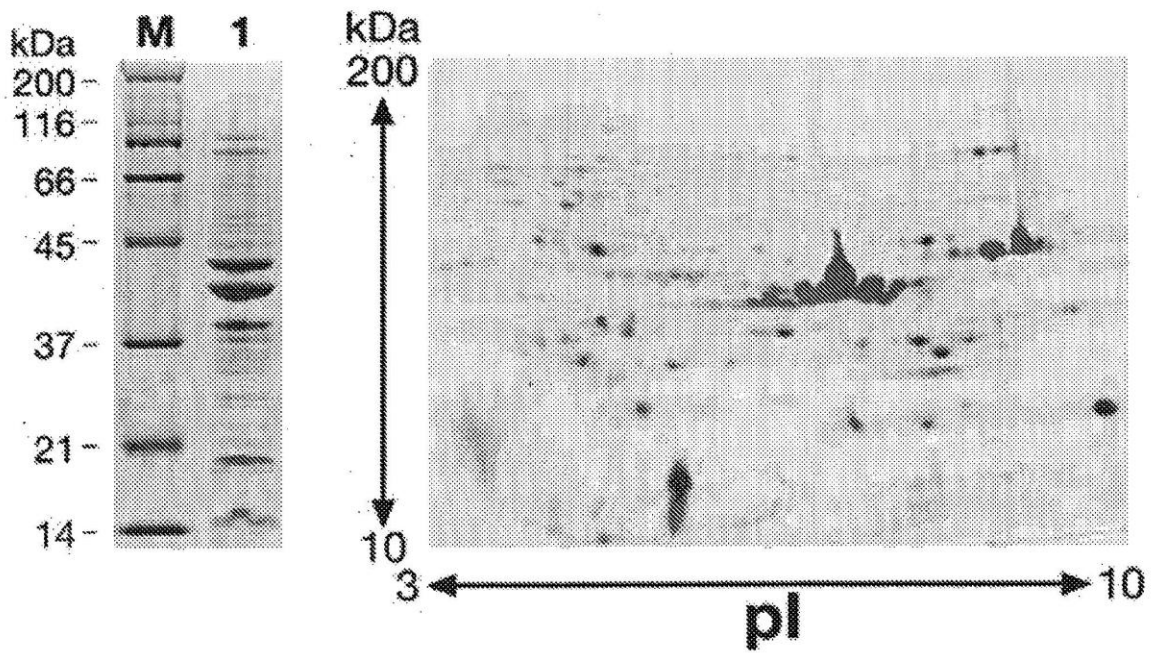


FIGURA 13

