

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 440**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2001 E 01959315 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1322328**

54 Título: **Vacunas para la protección de amplio espectro contra enfermedades causadas por Neisseria meningitidis**

30 Prioridad:

27.07.2000 US 221495 P

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

07.11.2014

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER
AT OAKLAND (100.0%)
5700 MARTIN LUTHER KING JR. WAY
OAKLAND, CA 94609, US**

72 Inventor/es:

**GRANOFF, DAN y
MOE, GREGORY R.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 519 440 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

Vacunas para la protección de amplio espectro contra enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis*

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a vacunas de amplio espectro para la prevención de enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis*, especialmente del serogrupo B.

10 **Antecedentes de la invención**

Neisseria meningitidis es un bacteria Gram-negativa que coloniza las vías respiratorias superiores de seres humanos y a nivel mundial es responsable de brotes epidémicos esporádicos y cíclicos, en especial, de meningitis y septicemia. Las tasas de ataque y morbilidad son más altas en niños de 2 años de edad.

15 Al igual que otras bacterias Gram-negativas, *Neisseria meningitidis* posee generalmente una membrana citoplasmática, una capa de péptidoglucano, una membrana externa que, junto con el polisacárido capsular, constituye la pared bacteriana, y formaciones pilosas (pili) que se proyectan hacia el ambiente exterior. Estas estructuras de la superficie median en la infección e interaccionan con el sistema inmunitario del hospedador. Por ejemplo, una primera etapa en la infección con *Neisseria* es la adherencia a células diana, que se piensa que está mediada por los pili y, posiblemente, por otras adhesinas tales como Opc. Se han descrito componentes de proteínas, fosfolípidos y polisacáridos de la membrana externa que provocan una respuesta inmunitaria.

25 *Neisseria meningitidis* spp. puede dividirse en grupos serológicos, tipos y subtipos basándose en reacciones con anticuerpos policlonales (Frasch, C. E. and Chapman, 1973, J. Infect. Dis. 127: 149-154) o monoclonales (Hussein, A., MONOCLONAL ANTIBODIES AND N. MENINGITIDIS. Proefschrift. Utrecht, Países Bajos, 1988) que interaccionan con diferentes antígenos de superficie. La seroagrupación se basa en variaciones inmunológicamente detectables en el polisacárido capsular. Se conocen aproximadamente 12 serogrupos: A, B, C, X, Y, Z, 29-E, W-135, H, I, K y L (Ashton, F. E. *et al.*, 1938, J. Clin. Microbiol. 17: 722-727; Branham, S. E., 1956, Can. J. Microbiol. 2: 175-188; Evans, A. C., 1920, Lab. Bull. 1245: 43-87; Shao-Qing, *et al.*, 1972, J. Biol. Stand. 9: 307-315; Slaterus, K W., 1961, Ant. v. Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 29: 265-271). Actualmente, el serogrupo B (MenB) es responsable de casi de la mitad al 80 % de las enfermedades invasivas descritas causadas por *Neisseria meningitidis*.

35 La serotipificación se basa en diferencias antigénicas definidas por anticuerpos monoclonales sobre una proteína de membrana externa denominada Porina B (PorB). Actualmente se conocen anticuerpos que definen aproximadamente 21 serotipos (Sacchi *et al.*, 1998, Clin. Diag. Lab. Immunol. 5: 348). La serosubtipificación se basa en variaciones antigénicas definidas por anticuerpos sobre una proteína de membrana externa denominada Porina A (PorA). Actualmente se conocen anticuerpos que definen aproximadamente 18 serosubtipos. La serosubtipificación es especialmente importante en cepas de *Neisseria meningitidis*, donde la inmunidad puede ser específica del serosubtipo. Gran parte de la variabilidad entre las proteínas PorA se produce en dos supuestos bucles (bucles I y IV) de ocho, expuestos en la superficie. Los bucles variables I y IV se han denominado VR1 y VR2, respectivamente. Dado que existen más variantes de secuencias VR1 y VR2 de PorA aún no definidas por anticuerpos específicos, se ha propuesto una nomenclatura alternativa basada en la tipificación de secuencias de aminoácidos de VR deducida a partir de la secuenciación de ADN (Sacchi *et al.*, 2000, J. Infect. Dis. 182: 1169; véase también la página web Tipificación multilocus de secuencias (*Multi Locus Sequence Typing*). También pueden utilizarse lipopolisacáridos como antígenos de tipificación, dando lugar a los inmunotipos denominados: L1, L2, etc.

50 *Neisseria meningitidis* también puede dividirse en grupos o subgrupos clonales, utilizando diversas técnicas que caracterizan directa o indirectamente el genoma bacteriano. Estas técnicas incluyen la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), basada en la variación de la movilidad electroforética de una enzima, que refleja los polimorfismos subyacentes en un locus genético particular. Caracterizando las variantes de diversas de dichas proteínas, se puede deducir la "distancia" genética entre dos cepas a partir de la proporción de emparejamientos erróneos. De manera similar, la clonalidad entre dos aislados puede deducirse si los dos tienen patrones idénticos de variantes electroforéticas en el número de loci. Más recientemente, la tipificación multilocus de secuencias (MLST) ha desbancado a la MLEE como el método de elección para la caracterización de los microorganismos. El uso de la MLST, la distancia genética entre dos aislados, o la clonalidad se deducen a partir de la proporción de emparejamientos erróneos en las secuencias de ADN de 11 genes conservativos en cepas de *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3140).

60 Dada la frecuencia y la importancia económica de las infecciones invasivas por *Neisseria meningitidis*, no es sorprendente que se hayan efectuado muchos intentos para desarrollar tratamientos. Aunque estas infecciones pueden tratarse con antibióticos, aproximadamente del 10 al 20 % de los pacientes tratados mueren, y muchos supervivientes quedan con secuelas neurológicas permanentes, tales como amputación, pérdida auditiva neurosensorial y parálisis. Además, los microorganismos pueden desarrollar resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, la prevención con vacunas es un modo preferible para contener la propagación de la infección.

Dado que la cápsula del polisacárido es una de las estructuras más externas de *Neisseria meningitidis* patógena, esta ha sido un enfoque primario de intentos para desarrollar vacunas. Se han usado diferentes preparaciones de polisacáridos capsulares para controlar los brotes y epidemias de los serogrupos A, C, Y W-135, así como vacunas mono, di, tri o tetravalentes (Gold *et al.*, 1969-1970, Bull. WHO 45: 272-282; Gotschlich *et al.*, 1969, J. Exp. Meal. 129: 134-136; Hankins, 1982, Proc. Soc. Biol. Med. 169: 54-57; Patente de Estados Unidos N° 6.080.589). Sin embargo, las vacunas de polisacáridos capsulares adolecen de: una mala o ninguna respuesta al polisacárido C en niños menores de 2 años; termolabilidad del polisacárido A; dificultades con respecto a la inducción de la tolerancia inmunológica después de la vacunación o revacunación con el polisacárido C (Granoff *et al.*, 1998, J. Infect. Dis. 160: 5028-5030; MacDonald *et al.*, 1998, JAMA 280: 1685-1689; MacDonald *et al.*, 2000, JAMA 283: 1826-1827). Para sortear estas propiedades inmunológicas, polisacáridos de los serogrupos A y C se han acoplado de forma covalente a proteínas transportadoras para constituir vacunas "conjugadas". A diferencia de las vacunas de polisacáridos simples estas vacunas conjugadas son muy inmunogénicas en lactantes, después de la reinyección provocan aumentos realizables en las concentraciones de anticuerpos anticapsulares en suero y sensibilizan la capacidad de generar respuestas de anticuerpos memoria frente a una inyección posterior de polisacárido simple (Campagne *et al.* 2000, Pediat. Infect. Dis. J. 19: 144-150; MacLennan *et al.*, 2000, JAMA 283: 2795-2801). Las vacunas conjugadas con propiedades similares han sido muy eficaces en la prevención de enfermedades invasivas causadas por otras bacterias encapsuladas, tales como *Haemophilus influenzae* de tipo b, o *Streptococcus pneumoniae*.

El polisacárido (PS) capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo B es un inmunógeno muy pobre en seres humanos (Wyle *et al.*, 1972, J. Infect. Dis. 126: 514-522; Zollinger, *et al.*, 1979, J. Clin. Invest. 63: 836-834; Jennings *et al.*, 1981, J. Immunol. 127: 104-108). Otros intentos para mejorar la inmunogenicidad del polisacárido a través de la conjugación con proteínas no han tenido éxito (Jennings *et al.*, 1981, J. Immunol. 127: 104-108). Para mejorar la inmunogenicidad, el polisacárido de la capsula meningocócica del serogrupo B (MenB PS) se ha modificado químicamente (el grupo N-propionilado se sustituyó por el grupo N-acetilo del polisacárido B) y se ha acoplado covalentemente a un conjugado de proteína transportadora (N-Pr-MenB PS-proteína). La vacuna induce en ratones altos títulos de anticuerpos IgG que son bactericidas y protectores (este concepto se describe y se reivindica en la Patente de Estados Unidos N° 4.727,136, presentada el 23 de febrero de 1988 por Jennings *et al.*). Esta vacuna también es inmunogénica en primates subhumanos, induciendo anticuerpos séricos que activan la bacteriolisis mediada por complemento (Fusco *et al.*, 1997, J. Infect. Dis. 175: 364-372). En seres humanos, se sabe que dichos anticuerpos confieren protección contra el desarrollo de enfermedades meningocócicas (Goldschneider *et al.*, 1969, J. Exp. Med. 129: 1307). Sin embargo, un subconjunto de los anticuerpos inducidos por esta vacuna tiene actividad autoanticuerpo contra el MenB PS no modificado (es decir N-acetil-MenB PS), Granoff *et al.*, 1998, J. Immunol; 160: 5028-5036, lo que plantea serias preocupaciones de seguridad sobre el uso de esta vacuna en seres humanos. Por lo tanto, los investigadores han buscado estrategias alternativas para desarrollar una vacuna segura y eficaz para la prevención de enfermedades causadas por las cepas del serogrupo B.

Otros grupos se han centrado en las proteínas de superficie como vacunas. Por ejemplo, el componente proteico principal de los pilus, la pilina, provoca una respuesta inmunitaria; sin embargo, como existen muchas variantes antigénicas y continúan desarrollándose, las vacunas contra la proteína de los pilus no ha sido muy eficaz. Véase, la Patente de Estados Unidos N° 5.597.572. En otros ejemplos, las vacunas se han centrado en la proteína A de superficie *Neisserial* (NspA) muy conservada (véase, por ejemplo, la Publicación PCT N° WO96/29412). Aunque el gen está muy conservado y se expresa prácticamente en todas las cepas, tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales preparados contra la NspA recombinante son bactericidas y/o proporcionan protección, contra solo aproximadamente el 50 % de cepas genéticamente diferentes (Moe *et al.* (1999 Infect. Immun. 67: 5664; Moe *et al.* Infect Immun. 2001 69: 3762). Estas observaciones sugieren que la NspA recombinante en solitario no proporcionará una protección adecuada contra a un amplio espectro de cepas *Neisseriales*.

No obstante otros grupos han usado preparaciones de membranas para inducir la inmunidad. En general, los intentos para producir una vacuna meningocócica B basada en vesículas de membrana externa usan inmunizaciones repetidas con material preparado a partir de una sola cepa o inmunización repetida con una vacuna que contiene antígenos de vesículas de múltiples cepas. Cuando la vacuna contenía antígenos de vesículas de más de una cepa, los títulos de anticuerpos bactericidas resultantes de bebés o niños que recibieron dos o tres dosis fueron bajos (Cartwright K *et al.*, 1999, Vaccine; 17: 2612-2619; de Kleinjn ED *et al.*, 2000, Vaccine, 18: 1456-1466), en estos estudios, y un estudio realizado en monos cinomolgos (Rouupe van der Voort ER, 2000, Vaccine, 18: 1334-1343) también había pruebas de interferencia inmunológica entre las respuestas al antígeno diferente. Cuando se usó inmunización repetida con vesículas de una sola cepa, se produjeron títulos más altos de anticuerpos, pero el espectro de reactividad de los anticuerpos se limitó solo a unas pocas cepas que tendían a ser serológicamente similares entre sí (Tappero *et al.*, 1999, JAMA 281: 1520; y Rouupe van der Voort ER, 2000, Vaccine, 18: 1334-1343). Los experimentos de los autores de la invención, realizados en modelos animales de laboratorio, descritos a continuación, confirmaron esta última observación. Los antisueros de animales de control que recibieron dos inmunizaciones secuenciales de una vacuna de vesículas de membrana externa, preparada en el Instituto Nacional de la Salud Pública, Oslo, Noruega, a partir de una sola cepa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, H44/76 (B:15:P1.7,16; "vacuna Noruega"), reaccionaron por citometría de flujo y fueron bactericidas solo contra cepas del serogrupo B que eran del mismo serosubtipo (es decir P1.7,16) o cepas (tales como las cepas P 1.10-4) que tenían un epítipo similar al epítipo P 1.16.

“Devi *et al*, FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 14, no. 4, páginas 211-220, julio de 1996 hacen referencia a la diversidad de unión de anticuerpos monoclonales con ácido alfa (2→8) polisialílico conjugado con vesículas de membrana externa a través de la dihidracida del ácido adípico”.

5 Los seres humanos son la única reserva de *Neisseria meningitidis* spp. conocida. De acuerdo con ello, las especies de *Neisseria* han desarrollado una amplia variedad de estrategias altamente eficaces para evadir el sistema inmunitario humano. Estas incluyen la expresión de una cápsula de polisacárido que reacciona en cruzado con el ácido polisialílico hospedador (es decir, el serogrupo B), y la alta mutabilidad antigénica para los epítomos inmunodominantes no capsulares, es decir, epítomos de antígenos que están presentes en la superficie en
10 cantidades relativamente grandes, son accesibles a los anticuerpos, y provocan una fuerte respuesta de anticuerpos.

Los esfuerzos anteriores para desarrollar vacunas de amplio espectro se han visto obstaculizados por la amplia variedad de estrategias altamente eficaces utilizadas por las especies de *Neisseria* para evadir el sistema
15 inmunitario humano. Debido a estas estrategias, una respuesta inmunitaria contra una cepa determinada a menudo no conferirá inmunidad eficaz contra otras cepas de *Neisseria*. La presente invención supera las desventajas de las estrategias de la técnica anterior a la vacunación y provoca inmunidad protectora contra una amplio espectro de cepas de *Neisseria meningitidis*, incluyendo en particular (pero no exclusivamente), cepas pertenecientes al serogrupo B.

20 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos y a vacunas para la prevención de enfermedades causadas por bacterias de *Neisseria meningitidis*, en particular cepas del serogrupo B.

25 La presente invención proporciona una primera, segunda y tercera preparación para su uso en un método de tratamiento de un mamífero, en el que dicho tratamiento provoca una inmunidad de amplio espectro contra una enfermedad causada por una cepa de *Neisseria meningitidis*,
30 en el que dicha primera preparación comprende vesículas de membrana externa (VME), microvesículas (MV) o tanto VME como MV de una primera cepa de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un primer serogrupo, primer serotipo y primer serosubtipo,
en el que dicha segunda preparación comprende las VME, las MV o tanto las VME como las MV de una segunda cepa de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un segundo serogrupo, un segundo serotipo y un segundo serosubtipo,
35 en el que dicha tercera preparación comprende las VME, las MV o tanto las VME como las MV de una tercera cepa de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un tercer serogrupo, tercer serotipo y tercer serosubtipo, y
en el que el serogrupo, serotipo y serosubtipo de la primera, segunda y tercera cepas de *Neisseria meningitidis* son diferentes, y en el que la primera, segunda y tercera preparaciones se usan en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra epítomos presentes en dichas preparaciones; comprendiendo el método la
40 administración en serie de la primera, segunda y tercera preparación de tal manera que la segunda preparación se administra después de que dicho mamífero se haya sensibilizado inmunológicamente por exposición a la primera preparación y la tercera preparación se administra después de que dicho mamífero se haya sensibilizado inmunológicamente por exposición a la segunda preparación,
en el que la administración de la primera, segunda y tercera preparación es suficiente para provocar una respuesta
45 inmunitaria en dicho mamífero, confiriendo dicha respuesta inmunitaria, inmunidad protectora contra una enfermedad causada por al menos una cepa de *Neisseria meningitidis*, y
en el que dicha primera, segunda y tercera preparación son eficaces para provocar una respuesta de anticuerpos bactericida contra al menos una cepa de *Neisseria meningitidis* que exprese un epítomo de serosubtipo no incluido en la primera, segunda o tercera preparación.

50 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La administración de la primera, segunda y tercera preparación da como resultado la inducción de una respuesta inmunitaria contra epítomos presentes en las preparaciones, en el que dicha respuesta confiere inmunidad protectora
55 contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis* spp.

La primera, segunda y tercera cepas de *Neisseria* son genéticamente diferentes entre sí, por ejemplo, la primera cepa es genéticamente diferente a la segunda cepa, a la tercera cepa o tanto a la segunda como a la tercera cepa.

60 La administración de las preparaciones es en serie. La administración de las preparaciones en serie puede realizarse en cualquier orden. Por ejemplo, los siguientes órdenes de administración están dentro del ámbito de la invención (de izquierda a derecha, VME-VME-VME, VME-VME-MV; VME-MV-MV; MV-MV-MV; MV-MV-VME; MV-VME-VME; VME-MV-VME; y MV-VME-MV. Preferentemente, el orden de administración es MV-MV-VME.

65 En una realización específica, la invención implica la administración de microvesículas (MV) en serie que forman ampollas de manera natural durante el crecimiento de *Neisseria meningitidis* y se liberan en el medio de cultivo

(recogido separando las células más grandes de las ampollas más pequeñas y después sedimentando las ampollas) y/o de vesículas de membrana externa (VME, preparadas directamente a partir de fracciones de membrana externa aisladas). Las VME y las MV se preparan a partir de cepas de *Neisseria meningitidis* "genéticamente diferentes", por ejemplo, cepas que difieren entre sí en al menos uno de serotipo o serosubtipo, y puede ser diferentes en loci genéticos múltiples, por ejemplo, difieren tanto en el serotipo como en el serosubtipo, por ejemplo, tienen diferentes proteínas Porinas, PorA y PorB, de membrana externa. Además, las preparaciones de VME y/o de MV se pueden administrar secuencialmente en al menos tres administraciones (por ejemplo, inyecciones) de VME o MV de cepas genéticamente diferentes; también se contemplan cuatro, cinco, seis o más administraciones.

La primera *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un primer serosubtipo; la segunda *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un segundo serosubtipo, cuyo segundo subserotipo es diferente del subserotipo de la primera *Neisseria meningitidis* spp, y la tercera *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un tercer serosubtipo, cuyo tercer subserotipo es diferente del subserotipo de al menos la primera, y preferentemente tanto de la primera como de la segunda *Neisseria meningitidis* spp.

La primera *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un primer serotipo y de un primer serosubtipo; la segunda *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un segundo serotipo y de un segundo serosubtipo, cuyo segundo serotipo y segundo serosubtipo son diferentes del serotipo y subserotipo de la primera *Neisseria meningitidis* spp, y la tercera *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un tercer serotipo y de un tercer serosubtipo, cuyo tercer serotipo y tercer subserotipo son diferentes del serotipo y subserotipo de al menos la primera y preferentemente tanto de la primera como de la segunda *Neisseria meningitidis* spp.

En una realización específica de la invención, una primera administración es con microvesículas (MV) preparadas a partir de una cepa de serogrupo C (por ejemplo RM1090 (C:2a:P1.5,2:L3,7)). La segunda administración es con MV preparadas a partir de una segunda cepa (por ejemplo BZ198 (B:NT:P1.4)) y la tercera administración es con vesículas de membrana externa (VME) preparada a partir de una tercera cepa (por ejemplo Z1092 (A:4,21:P1.10)). En lo sucesivo, en el presente documento, la inmunización secuencial con vesículas y/o con microvesículas preparadas a partir de cepas de *Neisseria meningitidis* genéticamente diferentes se denomina "vacuna CHORI" o "antígeno CHORI". La inmunización con una mezcla de la primera, segunda y tercera preparaciones de la vacuna CHOR se denomina "mezcla CHORI".

En el presente documento también se describe una composición que comprende una primera preparación seleccionada del grupo que consiste en vesículas de membrana externa (VME), microvesículas (MV) o tanto VME como MV de una primera especie de *Neisseria meningitidis*; una segunda preparación seleccionada del grupo que consiste en vesículas de membrana externa (VME), microvesículas (MV) o tanto VME como MV de una segunda especie de *Neisseria meningitidis*, donde la segunda *Neisseria meningitidis* spp. es genéticamente diferente a la primera especie de *Neisseria meningitidis*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender adicionalmente una tercera preparación seleccionada del grupo que consiste en vesículas de membrana externa (VME), microvesículas (MV) o tanto VME como MV de una tercera especie de *Neisseria meningitidis*, donde la tercera especie de *Neisseria meningitidis* es genéticamente diferente a la primera especie de *Neisseria meningitidis*. En realizaciones específicas, la primera preparación de la composición comprende MV, la segunda preparación comprende MV; y la tercera preparación comprende VME. Preferentemente, la primera y segunda especie de *Neisseria meningitidis* es genéticamente diferente ya que difieren en al menos uno de serotipo o serosubtipo, y cuando se incluyen, la tercera y la primera especie de *Neisseria meningitidis* son genéticamente diferentes ya que difieren en al menos uno de serotipo o serosubtipo.

En otros aspectos adicionales, en el presente documento se describe una composición que comprende al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, estando presente el antígeno aislado en la composición en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador mamífero, y caracterizándose como un inmunoprecipitado de proteína con antisueros producidos después de la vacunación con la vacuna CHORI, y que tiene una masa molecular aparente seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 59,5 kDa, aproximadamente 40,7 kDa, aproximadamente 39,6 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 27,9 kDa y 14.5 kDa; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, en el presente documento se describe una composición que comprende al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, estando el antígeno aislado presente en la composición en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador mamífero, y caracterizándose como una proteína detectada por transferencia de Western con antisueros producidos después de la vacunación de un mamífero con la vacuna CHORI, y que tiene una masa molecular aparente seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente de 53 kDa a 57 kDa; aproximadamente 46-47 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente de 20 kDa a 21 kDa; y aproximadamente 18 kDa; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, en el presente documento se describe una composición que comprende al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, estando el antígeno aislado presente en la composición en una cantidad eficaz para

provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador mamífero, donde el antígeno es de una proteína que se une específicamente a un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 1D9, 4B11, 9B8, y 14C7 (cuyos anticuerpos se describen en el presente documento y están depositados en la ATCC); y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Las composiciones que tienen antígenos aislados pueden comprender al menos dos antígenos de *Neisseria meningitidis* aislados.

10 En aspectos relacionados, esta divulgación representa métodos para provocar inmunidad protectora de amplio espectro contra una enfermedad causada por una especie de *Neisseria meningitidis*, comprendiendo dicho método administrar a un mamífero al menos una de las composiciones que comprenden antígenos aislados como se ha descrito anteriormente.

15 Preferentemente, las composiciones antigénicas (por ejemplo, preparaciones de VME/MV, preparaciones de proteínas aisladas) pueden administrarse a mamíferos, especialmente a seres humanos, que son inmunológicamente intactos con respecto a *Neisseria meningitidis* (es decir, que no se han expuesto a antígenos de *Neisseria meningitidis*, o no que se han expuesto a cantidades suficientes para provocar una respuesta inmunoprotectora). Una realización específica de la invención implica la administración a niños que tienen aproximadamente cinco años o más pequeños, especialmente niños de dos años o más pequeños.

20 En algunas realizaciones de la invención, antes de la administración de las composiciones antigénicas de *Neisseria meningitidis*, los individuos pueden haberse sensibilizado por exposición (a través de infección natural o administración) a especies de *Neisseria* distintas de *Neisseria meningitidis* (o a una composición antigénica preparada a partir de una especie de *Neisseria*).

25 Los antisueros obtenidos de ratones inmunizados, como se describe anteriormente, se unen a la superficie celular bacteriana de un grupo de cepas de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, genéticamente diferentes, como se determina por detección de inmunofluorescencia indirecta con citometría de flujo. En un ejemplo, los sueros de ratones inmunizados fueron positivos para las once de 12 cepas ensayadas. Estas 11 cepas incluyeron 3 cepas meningocócicas B con proteínas PorA y PorB respectivas que eran heterólogas a las de las cepas meningocócicas usadas para preparar los inmunógenos usados para la vacunación. (Por el contrario, los antisueros de animales inmunizados con dos inyecciones de la "vacuna de VME Noruega" descrita anteriormente reaccionaron por citometría de flujo solo con 5 cepas de 11. Las 5 cepas tenían proteínas PorA y/o PorB que eran idénticas o estaban estrechamente relacionadas con las de la "vacuna de VME Noruega"). Los antisueros de animales inmunizados con la "vacuna CHORI" también provocaron bacteriólisis mediada por complemento en 11 cepas de 12, un buen indicador de protección contra enfermedades en seres humanos (Goldschneider *et al*, 1969, J. Exp. Med. 129: 1307). La unión de anticuerpos a la superficie celular bacteriana, o bacteriólisis mediada por complemento, no se inhibió por la presencia de polisacárido de serogrupo B soluble en exceso, lo que confirma que los anticuerpos protectores se dirigen contra antígenos no capsulares.

40 Los antisueros de ratones inmunizados en un segundo ejemplo usando la vacuna CHORI fueron bactericidas contra 14 cepas de 14 ensayadas, incluyendo ocho cepas con serosubtipos que eran heterólogos a los usados en las preparaciones de vacunas. En un tercer ejemplo, los antisueros preparados a partir de cobayas inmunizadas con la vacuna CHORI eran bactericidas contra 9 cepas de 10 ensayadas, incluyendo 5 cepas con serosubtipos que eran heterólogos a los expresados por las cepas de la vacuna. Los antisueros contra la vacuna CHORI preparados en ratones en el primer ejemplo y en cobayas en el tercer ejemplo también fueron altamente protectores contra bacteremia en crías de ratas expuestas a la bacteria del serogrupo B. El protocolo de inmunización usado en el presente documento induce generalmente al sistema inmunitario a converger sobre antígenos no capsulares que son comunes a las cepas de las que se obtienen las MV y VME. La vacuna CHORI provoca anticuerpos contra múltiples epítomos de superficie celular, incluyendo, PorA, posiblemente PorB y proteínas conservadas tales como la proteína A de superficie Neisserial (NspA), la proteína de clase 4 (proteína modificable por reducción Rmp) y otros antígenos no capsulares aún no identificados.

55 En general, la composición para su uso en la presente invención que emplea inmunización secuencial con material antigénico preparado a partir de diferentes cepas (genéticamente diferentes) tiene la posibilidad de conferir protección contra la mayoría de las cepas de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. Esta estrategia también tiene amplia aplicabilidad para la vacunación contra cepas de *Neisseria meningitidis* representativas de otros serogrupos, tales como A, C, Y o W-135, y también contra otros miembros del género *Neisseria*.

60 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 resume los resultados de los ensayos clínicos de la eficacia de la vacuna de vesícula de membrana externa meningocócica.

65 La Figura 2 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE al 15 % de preparaciones de vacunas de microvesículas (MV), microvesículas extraídas con desoxicolato (MV DOC), vesículas de membrana externa (VME) y vesículas de membrana externa extraídas con desoxicolato (VME DOC) de las cepas meningocócicas Z1092

(A:4,21:P1.10), BZ198 (B:NT:P.1.4), y RM1090 (C:2a:P1.2), respectivamente. Carril 1, patrones de masa molecular. Carril 2, MV de Z1092. Carril 3, MV DOC de Z1092. Carril 4, VME de Z1092. Carril 5, VME DOC de Z1092. Carril 6, MV de BZ198. Carril 7, MV DOC de BZ198. Carril 8, VME de BZ198. Carril 9, VME DOC de BZ198. Carril 10, MV de RM1090. Carril 11, MV DOC de RM1090. Carril 12, VME de RM1090. Carril 13, VME DOC de RM1090.

La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran la unión de antisueros anti-vacuna CHORI, anti-vacuna noruega y control y Acm control con las cepas vivas meningocócicas B encapsuladas MC58 (B:15:P1.7,16) y S3446 (B:19,14:P1.23,14), determinada por citometría de flujo con fluorescencia indirecta. Todos los antisueros se ensayaron a diluciones de 1:20. El Acm control es un Acm murino anti-capsular específico (Granoff *et al.*, 1998, J. Immunol. 160: 5028-5036). Los antisueros control eran sueros agrupados de ratones inmunizados con proteínas de cultivo del sobrenadante de la cepa BL21 de *E. coli* o de cobayas inmunizadas con el adyuvante, hidróxido de aluminio, en solitario. Obsérvese que la cepa MC58 tiene el mismo serotipo y serosubtipo que el de la cepa utilizada para preparar la VME para la vacuna Noruega. El serotipo y serosubtipo de la cepa S3446 es heterólogo al de las cepas usadas para preparar ambas vacunas.

La Figura 4 presenta datos relativos a la unión de antisueros a la superficie celular bacteriana, determinada por citometría de flujo con fluorescencia indirecta.

La Figura 5 presenta datos que ilustran la reactividad de antisueros CHORI contra cepas de *N. meningitidis* de serogrupo A y C.

La Figura 6 resume los resultados de una prueba de bactericida que ensaya antisueros anti-vacuna CHORI, anti-rNspA y anti-vacuna-Noruega contra la cepa meningocócica B 2996.

La Figura 7 proporciona datos que muestran la actividad bactericida mediada por complemento de antisueros y anticuerpos.

La Figura 8 proporciona datos que muestran la actividad bactericida mediada por complemento de antisueros de ratones inmunizados con las vacunas indicadas.

La Figura 9 proporciona datos que muestran la actividad bactericida de antisueros de cobayas inmunizadas con las vacunas indicadas.

La Figura 10 proporciona datos que muestran la protección pasiva en crías de rata contra la bacteremia de la cepa B meningocócica 8047 por antisueros y anticuerpos.

La Figura 11 proporciona datos que muestran la protección pasiva en crías de rata contra la bacteremia meningocócica B de la cepa 8047 por antisueros de cobaya.

La Figura 12 es una fotografía de un gel SDS-PAGE al 15 % teñido con plata de proteínas expuestas en la superficie precipitadas por antisueros de antígeno anti-CHORI de la cepa meningocócica B no encapsulada M7. Carril 1, proteína total de M7. Carril 2, proteínas precipitadas por antisueros anti-CHORI murinos. Carril 3, proteínas precipitadas por antisuero de control negativo murino. Los números a la izquierda de la figura indican la masa molecular aparente en kDa.

La Figura 13 es una fotografía de una transferencia de Western de un gel de SDS-PAGE al 15 % de proteínas expuestas en superficie precipitadas por antisueros antigénicos anti-CHORI de la cepa meningocócica B no encapsulada M7. Carriles 1 y 4, proteína total de M7. Carriles 2 y 5, proteínas precipitadas por antisueros antigénicos anti-CHORI murinos. Carriles 3 y 6, proteínas precipitadas por antisueros de control negativo murinos. En los carriles 1 a 3 se usaron antisueros antigénicos anti-CHORI como anticuerpo de detección primario y en los carriles 4 a 6 como anticuerpo de detección primario se usó un Acm anti-PorA MN16C13F4 (Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu, Biltoven; Países Bajos) que es específico para el serosubtipo P1.2.

La Figura 14 proporciona datos que muestran las proteínas accesibles en las superficies bacterianas precipitadas por antisueros agrupados de ratones secuencialmente inmunizados con MV de la cepa MenC RM1090, MV de la cepa MenB BZ198 y VME de la cepa MenA Z1092

La Figura 14A proporciona ejemplos adicionales de datos que muestran las proteínas accesibles en la superficie bacteriana precipitadas por antisueros agrupados de ratones secuencialmente inmunizados con MV de la cepa MenC RM1090, MV de la cepa MenB BZ198 y VME de la cepa MenA Z1092.

La Figura 15 es una fotografía de una transferencia de Western de un gel de SDS-PAGE al 15 % de preparaciones de MV o VME. El antisuero de detección primario es antisuero de vacuna anti-CHORI/CFA de ratón agrupado en los carriles 1 a 3, anti-CHORI/Al₂(OPO₃)₃ de ratón agrupado en los carriles 4 y 5 y anti-CHORI/Al₂(OPO₃)₃ de cobaya agrupado en los carriles 6 a 8. Carriles 1 y 6, proteínas de MV preparadas a partir de la cepa RM1090. Carriles 2, 4 y 7, proteínas de MV preparadas a partir de la cepa BZ198. Carriles 3, 5 y 8, proteínas de VME preparadas a partir de la cepa Z1092. Los números a la izquierda de la figura indican masa molecular aparente en kDa.

La Figura 16 proporciona datos que muestran las masas moleculares aparentes de proteínas de las preparaciones de MV o VME indicadas que son reactivas con antisueros de ratones y cobayas que se inmunizaron secuencialmente con MV de la cepa MenC RM1090 y la cepa MenB BZ198, y con VME de la cepa MenA Z1092

La Figura 17 proporciona datos de ELISA que muestran la absorción de anticuerpos anti-LOS de antisueros agrupados obtenidos de ratones y cobayas secuencialmente inmunizados con MV de la cepa MenC RM1090 y la cepa MenB BZ198 y con VME de la cepa MenA Z1092, o con tres inyecciones de una mezcla de las tres preparaciones de vesículas.

La Figura 18 proporciona datos del ensayo bactericida mediado por complemento que muestran que la absorción de anticuerpos anti-LOS de antisueros agrupados obtenidos de ratones y cobayas secuencialmente inmunizados con MV de la cepa MenC RM1090 y la cepa MenB BZ198, y con VME de la cepa MenA Z1092, o con tres

inyecciones de una mezcla de las tres preparaciones de vesículas, no cambia significativamente la actividad bactericida de los antisueros contra cepas MenB que son homólogas o heterólogas a las cepas de vacuna.

La Figura 19 proporciona datos de un ELISA de células enteras que muestra ejemplos de Acm producidos a partir de ratones secuencialmente inmunizados con MV de la cepa MenC RM1090 y la cepa MenB BZ198 y con VME de la cepa MenA Z1092. Varios Acm son reactivos con todas las cepas meningocócicas ensayadas y otros reaccionan con un subconjunto de cepas limitado.

La Figura 20 resume actividad bactericida mediada por complemento de Acm preparados a partir de ratones inmunizados con antígeno anti-CHORI y ensayados contra diversas cepas MenB.

La Figura 21 resume los anticuerpos monoclonales, disponibles en el RIVM, que definen el serotipo y serosubtipo meningocócico.

La Figura 22 resume los anticuerpos monoclonales, disponibles en el NIBSC, que definen el serogrupo serotipo y serosubtipo.

Antes de describir la presente invención y las realizaciones ejemplares específicas de la misma, ha de entenderse que la esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, así pues, pueden, por supuesto, cambiar. Debe entenderse también que la terminología usada en este documento tiene la finalidad de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dictamine claramente otra cosa, entre el límite superior o inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido se incluye en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños que pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños también se incluyen en la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluya uno o los dos límites, los intervalos que excluyan cualquiera de ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado al entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención. A continuación se describen los materiales y métodos que ilustran la invención.

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La inmunización de lactantes, niños mayores y adultos con vacunas de vesículas de membrana externa (VME) meningocócicas induce anticuerpos bactericidas en suero, un concepto correlativo serológico de protección contra enfermedades (Goldschneider *et al.*, 1969, J. Exp. Med. 129: 1307). La eficacia de las vacunas de VME para la prevención de enfermedades meningocócicas B también se ha demostrado directamente en niños mayores y en adultos en ensayos clínicos aleatorios, prospectivos y en estudios de casos y controles retrospectivos. Véanse, por ejemplo, los resultados resumidos en la sección Antecedentes y en la Figura 1. Por lo tanto, la eficacia clínica de las vacunas de vesículas de membrana externa no se discute. Dichas vacunas están a punto de obtener la licencia para su uso en Noruega en niños mayores y en adultos y están en fase final de desarrollo clínico para obtener la licencia en otros países europeos. Una vacuna de VME preparada por el Instituto Finley en Cuba también está disponible en el comercio y se ha administrado a millones de niños en América del Sur.

La respuesta de anticuerpos bactericidas en suero contra las vacunas de VME tiende a ser específica de cepas (Tappero *et al.*, 1999, JAMA 281: 1520; y Roupe van der Voort ER, 2000, Vaccine, 18: 1334-1343). La proteína PorA es inmunodominante, y la inmunidad inducida es predominantemente específica para las cepas de las que se obtuvieron las vesículas de membrana (Tappero *et al.*, 1999, JAMA 281: 1520; Martin SL *et al.*, 2000, Vaccine, 18: 2476-2481). Esta limitación se debe principalmente a la variabilidad antigénica de la proteína PorA y es particularmente genuina en lactantes que son inmunológicamente intactos (Tappero *et al.*) con respecto a una exposición previa a antígenos *Neisseriales*.

Así pues, la presente invención implica provocar una respuesta inmunitaria que es ampliamente reactiva con diversas cepas de *N. meningitidis* productoras de enfermedades. La invención soslaya el problema de la inmunodominancia de dominios antigénicamente variables de PorA en vacunas basadas en vesículas o en la proteínas PorA centrando la respuesta de anticuerpos en antígenos comunes en las cepas de vacunas. Es importante destacar que los métodos de la invención provocan anticuerpos bactericidas en suero, el único un concepto correlativo serológico de protección demostrado en seres humanos (Goldschneider *et al.* 1969, citado anteriormente), contra cepas de *Neisseria* que expresan epítomos de serosubtipo que no se usaron en las preparaciones de vacunas. Además, el método provoca anticuerpos bactericidas en suero contra cepas no eliminadas por el anticuerpo contra una proteína conservada, tal como la proteína A de superficie de *Neisseria*, una vacuna meningocócica candidata (Martin *et al.*, 2000. J. Biotechnol. 83: 27-31; Moe *et al.* (1999 Infect. Immun. 67: 5664; Moe *et al.* Infect Immun. 2001 69: 3762). Sin aferrarse a la teoría, el régimen de vacunas e inmunización de la invención proporciona sus ventajas inesperadas en la inmunidad protectora de amplio espectro provocando

anticuerpos que son específicos para antígenos tanto conservados como no conservados.

A. Definiciones

5 La expresión “inmunidad protectora” significa que un programa de vacunación o inmunización que se administra a un mamífero induce una respuesta inmunitaria que previene, retrasa el desarrollo de, o reduce la gravedad de una enfermedad que es causada por *Neisseria meningitidis*, o disminuye o elimina por completo los síntomas de la enfermedad.

10 La frase “una enfermedad causada por una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*” incluye cualquier síntoma clínico o combinación de síntomas clínicos que están presentes en una infección con un miembro del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. Estos síntomas incluyen, pero sin limitación: la colonización del tracto respiratorio superior (por ejemplo, mucosa de la nasofaringe y amígdalas) por una cepa patógena del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, la penetración de las bacterias en la mucosa y en el lecho vascular submucoso, septicemia, choque séptico, inflamación, lesiones hemorrágicas de la piel, la activación de la fibrinólisis y de la coagulación sanguínea, disfunción de órganos, tales como riñón, pulmón e insuficiencia cardíaca, hemorragia suprarrenal e infarto muscular, filtración capilar, edema, isquemia periférica en extremidades, síndrome de distrés respiratorio, pericarditis y meningitis.

20 La frase “inmunidad protectora de amplio espectro” significa que un programa de vacunación o inmunización provoca “inmunidad protectora” contra al menos uno o más (o contra al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, contra al menos ocho, o al menos contra más de ocho) cepas de *Neisseria meningitidis*, donde cada una de las cepas pertenece a un serosubtipo diferente al de las cepas usadas para preparar la vacuna. La invención contempla e incluye específicamente una vacuna o un régimen de vacunación que confiere protección contra una enfermedad causada por un miembro del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* y también contra otros serogrupos, en particular, serogrupos A, C, Y W-135.

30 La frase “se une específicamente a un anticuerpo” o “específicamente inmunoreactivo con”, cuando se refiere a un antígeno, tal como un polisacárido, fosfolípido, proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que se basa en y/o demuestra la presencia del antígeno en una muestra que también puede incluir una población heterogénea de otras moléculas. Por lo tanto, en las condiciones de inmunoensayo indicadas, el anticuerpo (o anticuerpos), específico se une a un antígeno (o antígenos) particular en una muestra y no se une, en una cantidad significativa, a otras moléculas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir un anticuerpo o antisuero que se selecciona por su especificidad por un antígeno (o antígenos) particular.

35 La frase “en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra epítomos presentes en dicha preparación” significa que hay una diferencia detectable entre un indicador de respuesta inmunitaria medido antes y después de la administración de una preparación de antígeno particular. Como indicadores de respuesta inmunitaria se incluyen, pero sin limitación: el título o la especificidad de los anticuerpos, como se detecta mediante un ensayo, tal como el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), un ensayo bactericida, citometría de flujo, inmunoprecipitación, inmunodifusión de Ouchter-Lowny; ensayos de detección de unión, por ejemplo, de manchas, de transferencia de Western o de matrices de antígenos; ensayos de citotoxicidad, etc.

45 Un “antígeno de superficie” es un antígeno que está presente en una estructura de la superficie de *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, la membrana externa, la membrana interna, el espacio periplasmático, cápsula, pili, etc.).

50 La frase “genéticamente diferente” como se usa en el contexto de cepas genéticamente diferentes de *Neisseria meningitidis*, se refiere a cepas que difieren entre sí en la secuencia de aminoácidos de al menos uno, y normalmente al menos dos, más normalmente al menos tres polipéptidos, particularmente polipéptidos antigénicos. La diversidad genética de cepas puede realizarse seleccionando cepas que difieren en el serogrupo, serotipo y serosubtipo (por ejemplo, dos cepas que difieren en al menos una de las proteínas seleccionadas de la membrana externa, proteínas PorA y PorB, se dice que son genéticamente distintas entre sí). La diversidad genética también puede definirse, por ejemplo, por tipificación multilocus de secuencias y/o por tipificación multilocus de enzimas (véase, por ejemplo, Maiden *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3140; Pizza *et al.* 2000 Science 287: 1816), por electroforesis de enzimas multilocus y por otros métodos conocidos en la técnica.

55 “Serogrupo”, como se usa en el presente documento, se refiere a la clasificación de *Neisseria meningitidis* en virtud de variaciones inmunológicamente detectables en el polisacárido capsular. Se conocen aproximadamente 12 serogrupos: A, B, C, X, Y, Z, 29-E, W-135, H, I, K y L. Uno cualquiera del serogrupo puede incluir serotipos múltiples y serosubtipos múltiples.

60 “Serotipo”, como se usa en el presente documento, se refiere a la clasificación de las cepas de *Neisseria meningitidis* basándose en diferencias antigénicas definidas por anticuerpos monoclonales en la proteína de membrana externa Porina B. Un solo serotipo puede encontrarse en serogrupos múltiples y serosubtipos múltiples.

65 “Serosubtipo”, como se usa en el presente documento, se refiere a la clasificación de cepas de *Neisseria meningitidis* basándose en variaciones antigénicas definidas por anticuerpos en una proteína de membrana externa

denominada Porina A, o basándose en la tipificación de secuencias de aminoácidos de VR deducida a partir de la secuenciación de ADN (Sacchi *et al.*, 2000, J. Infect. Dis. 182: 1169; véase también la página web Tipificación multilocus de secuencias (*Multi Locus Sequence Typing*). Gran parte de la variabilidad entre las proteínas PorA se produce en dos supuestos bucles (bucles I y IV) de ocho, expuestos en la superficie. Los bucles variables I y IV se han denominado VR1 y VR2, respectivamente. Un solo serosubtipo puede encontrarse en serogrupos múltiples y en serotipos múltiples.

Preparación “enriquecida” significa que, en una composición antigénica, un investigador experimental o un especialista clínico, manipula un antígeno de manera que esté presente a una concentración en peso total al menos tres veces mayor, preferentemente al menos una concentración 10 veces mayor, más preferentemente a una concentración al menos 100 veces mayor y más preferentemente a una concentración al menos 1.000 veces mayor que la concentración de ese antígeno en la cepa de la que se obtuvo la composición antigénica. Por lo tanto, si la concentración de un anticuerpo particular es de 1 microgramo por gramo de preparación bacteriana total (o de proteína bacteriana total), una preparación enriquecida contendría al menos 3 microgramos por gramo de preparación total bacteriana (o de proteína bacteriana total).

La expresión individuo “inmunológicamente intacto con respecto a *Neisseria meningitidis*” se refiere a un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un paciente humano) que nunca se ha expuesto (a través de infección o administración) a *Neisseria meningitidis* o a una composición antigénica derivada de *Neisseria meningitidis* en cantidades suficientes para provocar una inmunidad protectora, o si se ha expuesto, no pudo generar una respuesta inmunoprotectora. (Un ejemplo de lo anterior sería un individuo expuesto a una edad demasiado joven cuando no pueden producir respuestas inmunoprotectoras. Molages *et al.*, 1994, Infect. Immun. 62: 4419-4424). Además, es deseable (pero no necesario) que el individuo “inmunológicamente intacto” tampoco se haya expuesto a una especie de *Neisserial* distinta de *Neisseria meningitidis* (o a una composición antigénica preparada a partir de una especie *Neisserial*), particularmente una cepa de reacción cruzada de especies de *Neisseria* (o composición antigénica). Los individuos que se han expuesto (a través de infección o administración) a una especie *Neisserial* o a una composición antigénica derivada de esas especie *Neisserial* en cantidades suficientes para provocar una respuesta inmunitaria contra los epítomos que presentan esas especies, están “sensibilizados” para responder inmunológicamente a los epítomos que presentan estas especies.

B. Preparación de fracciones de *Neisseria meningitidis* y detección de antígenos y composiciones antigénicas que confieren inmunoprotección

1. Composiciones antigénicas

Las diversas composiciones antigénicas (por ejemplo, células lisadas, fracciones subcelulares, MV y VME, o antígenos individuales y combinaciones de antígenos detectados y aislados como se ha descrito anteriormente y en lo sucesivo) que se administran a un animal (especialmente a un paciente humano) para inducir una respuesta inmunitaria se obtienen generalmente por métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las operaciones antigénicas que se usan para provocar una respuesta inmunitaria se preparan cultivando *Neisseria meningitidis* spp. usando técnicas de cultivo de bacterias conocidas y preparando una fracción que contiene antígenos que inducen inmunoprotección.

Una fracción preferida comprende microvesículas (MV) o ampollas que se liberan durante el cultivo de dicha *Neisseria meningitidis* spp. Las MV pueden obtenerse cultivando una cepa de *Neisseria meningitidis* en medio de caldo de cultivo, separando las células completas del medio de caldo de cultivo (por ejemplo, por filtración, o por una centrifugación a baja velocidad que sedimente solamente las células y no las ampollas más pequeñas, o similar) y después recogiendo las MV que estén presentes en el medio de cultivo acelular (por ejemplo por filtración, precipitación o agregación diferencial de las MV o por centrifugación a alta velocidad que sedimente las ampollas, o similar). Para su uso en la producción de las MV, las cepas pueden seleccionarse generalmente basándose en la cantidad de ampollas producidas en el cultivo (por ejemplo, pueden cultivarse bacterias en un número razonable para proporcionar la producción de ampollas adecuadas para el aislamiento y administración en los métodos descritos en el presente documento). Una cepa ejemplar que produce altos niveles de ampollas se describe en la Publicación PCT N° WO 01/34642. Además de la producción de ampollas, para su uso en la producción de las MV, las cepas también pueden seleccionarse basándose en la producción de NspA, donde pueden ser preferibles las cepas que producen niveles más altos de NspA (para ejemplos de cepas de *N. meningitidis* que tienen diferentes niveles de producción de NspA, véase, por ejemplo Moe *et al.* (1999 Infect. Immun. 67: 5664).

Una segunda fracción preferida comprende vesículas de membrana externa (VME) preparadas a partir de la membrana externa de una cepa cultivada de *Neisseria meningitidis* spp. Las VME pueden obtenerse a partir de una *Neisseria meningitidis* desarrollada en medio de caldo de cultivo o sólido, preferentemente separando las células bacterianas del medio de cultivo (por ejemplo, por filtración o por centrifugación a baja velocidad que sedimente las células o similar), lisando las células (por ejemplo por adición de detergente, choque osmótico, ultrasonidos, cavitación, homogeneización o similar) y separando una fracción de membrana externa de las moléculas citoplasmáticas (por ejemplo por filtración; o por preparación o agregación diferencial de membranas externas y/o vesículas de membrana externa o por métodos de separación por afinidad usando ligandos que reconocen

específicamente moléculas de membrana externa; o mediante centrifugación a alta velocidad que sedimente las membranas externas y/o vesículas de membrana externa, o similar); para producir las VME pueden usarse fracciones de membrana externa.

5 En la producción de las MV o VME, puede ser preferible usar cepas que sean productoras relativamente bajas de endotoxina (lipopolisacárido, LPS) para disminuir la necesidad de eliminar la endotoxina de la preparación final antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, la VME y/o MV puede prepararse a partir de mutantes de estas cepas de *Neisseria* en las que el lipooligosacárido u otros antígenos, que pueden ser indeseables en una vacuna (por ejemplo Rmp), se reduzcan o eliminen.

10 Cuando se desee (por ejemplo, cuando las cepas usadas para producir las MV o VME estén asociadas con endotoxina o niveles altos particulares de endotoxina), las MV o VME se tratan opcionalmente para reducir la endotoxina, por ejemplo, reducir la toxicidad después de la administración. La reducción de la endotoxina puede realizarse por extracción con un detergente adecuado (por ejemplo, BRIJ-96, desoxicolato sódico, lauril sarcosinato sódico, Empigen BB, Triton X-100, TWEEN 20 (monolaurato de polioxietileno sorbitán), TWEEN 80, a una concentración de 0,1-10 %, preferentemente 0,5-2 %). Cuando se utiliza la extracción con detergente, se prefiere utilizar un detergente distinto de desoxicolato. La extracción de preparaciones de VME y MV con desoxicolato da como resultado la eliminación de algunos antígenos de proteína no capsulares (véase la Figura 2). La vacunación de animales con preparaciones de VME o MV sometidas a extracción con desoxicolato provoca una respuesta inmunitaria que se asoció con títulos más bajos de anticuerpos bactericidas en comparación con la vacunación realizada con material no extraído con desoxicolato.

Además, de las MV o VME, pueden utilizarse antígenos aislados o combinaciones particulares para inducir una respuesta inmunoprotectora. La identidad de los antígenos aislados o combinaciones de antígenos se describe más adelante.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno, así como cualquier otro componente compatible, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico o individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la valoración de la situación médica por el médico tratante, y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad estará en un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse mediante pruebas rutinarias. La dosificación del tratamiento se puede realizar en una pauta de una sola dosis o en una pauta de múltiples dosis (por ejemplo, incluyendo dosis de recuerdo). La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

Las composiciones antigénicas o antígenos individuales a administrar se proporcionan en una solución farmacéuticamente aceptable tal como una solución acuosa, con frecuencia una solución salina, o pueden proporcionarse en forma de polvo. Las composiciones también pueden incluir un adyuvante. Son ejemplos de adyuvantes adecuados conocidos que pueden usarse en seres humanos, pero sin limitarse a estos necesariamente, el alumbre, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, MF59 (escualeno al 4,3 % p/v, Tween 80 al 0,5 % p/v, Span 85 al 0,5 % p/v), ácido nucleico que contenga CpG (en el que la citosina no está metilada), QS21, MPL, 3DMPL, extractos de Aquilla, ISCOMS, mutantes LT/CT, micropartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG), Quil A, interleucinas, y similar. Para animales experimentales, puede usarse adyuvante de Freund, N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramyl-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, citado como nor-MDP), N-acetilmuramyl-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, citado como MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80. La eficacia de un adyuvante puede determinarse midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el antígeno inmunogénico.

Otro ejemplos de adyuvantes para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación: (1) formulaciones de emulsiones de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como muramyl péptidos (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59™ (documento WO90/14937, Capítulo 10 en Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene Escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (conteniendo opcionalmente MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador, (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, 5% de polímero L121 bloqueado con pluronic, y thr-MDP bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometido a agitación vorticial para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande, y (c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene Escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana tales como monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de paredes bacterianas (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); (2) pueden usarse adyuvantes de saponina, tales como QS21 o Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas de ellos tales como ISCOM (complejos

inmunoestimuladores), cuyos ISCOMS pueden estar desprovistos de detergente adicional, por ejemplo, documento WO00/07621; (3) Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (4) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL), por ejemplo, documentos GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente, en ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos neumocócicos, por ejemplo, documento WO00/56358; (6) combinaciones de 3dMPL, por ejemplo, con QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, por ejemplo, documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG [Krieg Vaccine 2000, 19, 618-622; Krieg Curr opin Mol Ther 2001 3: 15-24; Roman *et al.*, Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, J. Immunol, 1998, 160, 870-876; Chu *et al.*, J. Exp. Med, 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, Ear. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; Moldoveami *et al.*, Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg *et al.*, Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, J. Immunol, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, J. Immunol, 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, Cell Immunol, 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, J. Immunol, 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, J. Immunol, 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, J. Immunol, 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, J. Immunol, 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, J. Immunol, 1998, 160, 4755-4761; y Yi *et al.*, J. Immunol, 1998, 160, 5898-5906; solicitudes de Patente Internacional WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581] es decir que contiene al menos un dinucleótido CG, en el que la citosina no está metilada; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo, documento WO99/52549; (9) un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) o un tensioactivo de éter o éster de polioxietileno alquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO01/21152); (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo un oligonucleótido CpG) (documento WO00/62800); (11) un inmunoestimulador y una partícula de sal metálica, por ejemplo, documento WO00/23105; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo, documento WO99/11241; (13) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IM2 (opcionalmente + un estero) por ejemplo documento WO98/57659; (14) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para potenciar la eficacia de la composición. Los muramilpéptidos incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-25 acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarinil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamin MTP-PE), etc.

Los antígenos pueden combinarse con excipientes convencionales, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como ajuste de pH y agentes tampón, agentes de ajuste de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración del antígeno en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similar de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y con las necesidades del paciente. Las composiciones resultantes pueden estar en forma de una solución, suspensión, comprimido, píldora, cápsula, polvo, gel, crema, loción, pomada, aerosol o similares.

Las concentraciones de los antígenos inmunogénicos de la invención en las formulaciones farmacéuticas pueden variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,1 %, normalmente, o al menos aproximadamente, al 2 % hasta a lo sumo del 20 % al 50 % o más en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado.

2. Inmunización

Las MV y/o VME usadas en la presente invención se administran por vía oral, nasal, nasofaríngea, parenteral, entérica, gástrica, tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, en forma de comprimido, sólido, polvo, líquido, aerosol, local o sistémica, con o sin excipientes añadidos. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos u obvios para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1980). La administración de las MV y/o VME se realiza como se describe con más detalle a continuación.

Se reconoce que los polipéptidos y compuestos relacionados descritos anteriormente, cuando se administran por vía oral, deben protegerse de la digestión. Esto se realiza generalmente ya sea por los complejos de proteína con una composición para hacerla resistente a la hidrólisis ácida y enzimática, o envasando la proteína en un vehículo apropiadamente resistente tal como un liposoma. En la técnica se conocen bien medios para proteger a las proteínas de la digestión.

Con el fin de mejorar la semivida en suero, las preparaciones antigénicas que se inyectan también pueden encapsularse, introducirse en el lumen de liposomas, prepararse como un coloide, o pueden emplearse otras técnicas convencionales que proporcionen una semivida en suero prolongada de los péptidos. Varios métodos están

disponibles para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. Las preparaciones también pueden proporcionarse en formas de liberación controlada o liberación lenta para liberar y administrar las preparaciones antigénicas de forma que se mezclen o en serie.

Las composiciones se administran a un animal que está en riesgo de adquirir una enfermedad *Neisserial* para prevenir o al menos detener parcialmente el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para su uso terapéutico dependerán, por ejemplo, de la composición antigénica, de la manera de la administración, del peso y del estado general de salud del paciente, y del criterio del médico que prescribe. Las dosis únicas o múltiples de las composiciones antigénicas se pueden administrar dependiendo de la dosificación y frecuencia necesaria y tolerada por el paciente y de la vía de administración.

Las composiciones antigénicas descritas en el presente documento se administran en serie. En primer lugar, a un individuo se le administra una dosis terapéuticamente eficaz de una primera composición antigénica (por ejemplo MV y/o VME, con o sin excipientes) preparada a partir de una primera cepa de *Neisseria*. La primera composición antigénica se administra generalmente en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación de linfocitos B y/o T). Las cantidades para la inmunización inicial generalmente varían de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1,0 mg por 70 kilogramos del paciente, más normalmente de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 0,2 mg por 70 kg del paciente. Pueden usarse dosificaciones de 0,001 a aproximadamente 10 mg por paciente al día, particularmente cuando el antígeno se administra a un sitio aislado y no a la corriente sanguínea, tal como dentro de una cavidad corporal o en un lumen de un órgano. Dosis sustancialmente superiores (por ejemplo de 10 a 100 mg o más) son posibles en la administración oral, nasal o tópica.

Después de la administración de la primera composición antigénica, a un individuo se le administra una dosis terapéuticamente eficaz de una segunda composición antigénica (por ejemplo, MV y/o VME, con o sin excipientes) preparada a partir de una segunda cepa de *Neisseria*, después de que el individuo se haya sensibilizado inmunológicamente por exposición a la primera composición antigénica. El refuerzo puede administrarse días, semanas o meses después de la inmunización inicial, dependiendo de la respuesta y de la afección del paciente. La existencia de una respuesta inmunitaria contra la primera composición antigénica puede determinarse por métodos conocidos (por ejemplo, obteniendo suero del individuo antes y después de la inmunización inicial, y demostrando un cambio en el estado inmunitario del individuo, por ejemplo, un ensayo de inmunoprecipitación, o un ELISA, o un ensayo bactericida, o a una transferencia de Western, o un ensayo de citometría de flujo o similar) y/o demostrando que la magnitud de la respuesta inmunitaria contra la segunda inyección es mayor que la de los animales de control inmunizados por primera vez con la composición de la materia usada para la segunda inyección (por ejemplo sensibilización inmunológica). La sensibilización inmunológica y/o la existencia de una respuesta inmunitaria contra la primera composición antigénica también puede presuponerse esperando durante un periodo de tiempo después de la primera inmunización que, basándose en la experiencia previa, sea un tiempo suficiente para que se produzca una respuesta inmunitaria y/o sensibilización, por ejemplo, 2, 4, 6, 10 o 14 semanas. Las dosificaciones de refuerzo de la segunda composición antigénica son generalmente de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1,0 mg de antígeno, dependiendo de la naturaleza del inmunógeno y de la vía de inmunización.

Una dosis terapéuticamente eficaz de una tercera composición de antígeno preparada a partir de una tercera cepa de *Neisseria* se administra a un individuo después de que el individuo se haya sensibilizado y/o generado una respuesta inmunitaria contra la segunda composición antigénica. El tercer refuerzo puede administrarse días, semanas o meses después de la segunda inmunización, dependiendo de la respuesta y afección del paciente. La existencia de sensibilización y/o de una respuesta inmunitaria contra la segunda composición antigénica puede determinarse mediante los mismos métodos utilizados para detectar una respuesta inmunitaria contra la segunda composición antigénica. La existencia de sensibilización y/o de una respuesta inmunitaria contra la segunda composición antigénica también puede presuponerse esperando durante un periodo de tiempo después de la segunda inmunización que, basándose en la experiencia previa, sea un tiempo suficiente para que se produzca una respuesta inmunitaria, por ejemplo, 2, 4, 6, 10 o 14 semanas. Las dosificaciones de refuerzo de la segunda composición antigénica son generalmente de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1,0 mg de antígeno, dependiendo de la naturaleza del inmunógeno y de la vía de inmunización. La presente invención contempla además el uso de una cuarta, quinta, sexta o más inmunización de refuerzo, utilizando bien una cuarta, quinta o sexta cepa de *Neisseria meningitidis* o cualquiera de la primera, segunda o tercer cepas, u otra cepa que sea genéticamente distinta con respecto a al menos una de la primera, segunda y tercera cepas.

Cuando la administración de las composiciones antigénicas preparadas a partir de la primera, segunda y tercera cepas es en serie, el orden de administración de las composiciones puede variar. Por ejemplo, el orden de la administración de VME y/o MV en estas etapas de administración en serie puede variar. Por ejemplo, dentro del ámbito la invención se encuentran los siguientes órdenes de administración (de izquierda a derecha, siendo la tercera administración opcional): VME-VME-VME; VME-VME-MV; VME-MV-MV; MV-MV-MV; MV-MV-VME; MV-VME-VME; VME-MV-VME; y MV-VME-MV. Preferentemente, el orden de la administración es MV-MV-VME.

La primera y segunda cepas de *Neisseria* son genéticamente distintas entre sí, por ejemplo, las cepas pertenecen a diferentes serogrupos PorB y/o serosubtipos PorA; y también pertenecen a diferentes serogrupos capsulares. Además, la segunda y tercera cepas de *Neisseria* son genéticamente distintas entre sí, por ejemplo, las cepas pertenecen a serotipos y serosubtipos diferentes; y también pertenecen a serogrupos diferentes. La tercera cepa de *Neisseria* es preferentemente genéticamente distinta con respecto a la primera y segunda cepas, pero en algunas realizaciones, puede no ser genéticamente diferente con respecto a la primera cepa. Por ejemplo, el serotipo y/o serosubtipo de la tercera cepa de *Neisseria* debe ser diferente de la primera y segunda cepa.

La presente invención también contempla específicamente que las composiciones antigénicas de otros miembros del gen *Neisseria* se puedan administrar como se describe en el presente documento para generar inmunoprotección contra *Neisseria meningitidis*. Por ejemplo, *Neisseria lactamica*, un miembro comensal no encapsulado, no patógeno, del género *Neisseria* que se encuentra comúnmente en la nasofaringe humana, incluye cepas que tienen muchos antígenos presentes en *N. meningitidis* y, por lo tanto, también pueden usarse para preparar uno de los inmunógenos contemplados en la presente invención. Por lo tanto, las MV y VME de *Neisseria lactamica* no patógena puede usarse para sensibilizar o provocar una respuesta inmunoprotectora contra *Neisseria meningitidis* (o contra otras *Neisserias* patógenas tales como *Neisseria gonorrhoea*). Esto puede realizarse administrando inicialmente una composición antigénica (por ejemplo, MV o VME) de *Neisseria lactamica*, seguido de la administración de una segunda y opcionalmente una tercera composición antigénica de *Neisseria meningitidis* (o *Neisseria gonorrhoea*). La invención también contempla específicamente que las composiciones antigénicas de las cepas de *Neisseria lactamica* puedan usarse para la administración inicial, secundaria y cualquier administración posterior, en el que cada cepa de *lactamica* tiene un serotipo y/o serosubtipo diferente en comparación con las otras.

La invención también contempla que las composiciones antigénicas usadas en cualquier etapa en el protocolo de inmunización puedan obtenerse de una o más cepas de bacterias (especialmente *Neisseria lactamica* o *Neisseria meningitidis*) que se modifican genéticamente por métodos conocidos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.013.267) para expresar uno o más ácidos nucleicos que codifiquen una o más moléculas de interés, particularmente moléculas que susciten o potencien una respuesta inmunoprotectora. Los ácidos nucleicos pueden codificar, por ejemplo, Porina A, Porina B, NspA, pilina, u otras proteínas *Neisseriales*. Otros ácidos nucleicos ejemplares incluyen aquellos que codifican proteínas *Neisseriales* inmunoprecipitadas con antiseros producidos después de la vacunación con la vacuna CHORI, particularmente aquellas proteínas que tienen masas moleculares aparentes de aproximadamente 80 kDa, de aproximadamente 59,5 kDa, de aproximadamente 40,7 kDa, de aproximadamente 39,6 kDa, de aproximadamente 33 kDa, de aproximadamente 27,9 kDa y 14,5 kDa, o fragmentos antigénicos de las mismas. Otros ácidos nucleicos ejemplares incluyen aquellos que codifican proteínas *Neisseriales* que se detectan por transferencia de Western con antiseros producidos después de la vacunación con la vacuna CHORI, particularmente aquellas proteínas que tienen masas moleculares aparentes de aproximadamente 53 kDa-57 kDa; de aproximadamente 46-47 kDa, de aproximadamente 33 kDa, de aproximadamente 20 kDa a 21 kDa; y de aproximadamente 18 kDa. Los ácidos nucleicos pueden codificar cualquiera de las proteínas anteriores que esté truncada, o alterada para incluir o delecionar un sitio de glucosilación, o para incluir o seleccionar cualquier epítipo, o para aumentar la expresión de cualquiera de las proteínas anteriores. Son de particular interés los fragmentos antigénicos de dichas proteínas. Además, las composiciones antigénicas de la invención pueden comprender antígenos adicionales de *N. meningitidis* tales como los ilustrados en las Publicaciones PCT Nos WO 99/24578, WO 99/36544; WO 99/57280, WO 00/22430 y WO 00/66791, así como fragmentos antigénicos de dichas proteínas.

Un aspecto importante de la presente invención es que las composiciones antigénicas usadas para sensibilizar y reforzar una amplia inmunidad protectora contra *Neisseria meningitidis* se preparan a partir de cepas de *Neisseria* que poseen antígenos inmunodominantes variantes (los antígenos principales que se detectan rutinariamente por antiseros de diferentes animales hospedadores que se han infectado con *Neisseria*; ejemplos representativos incluyen Porina A, Porina B, pilina, NspA etc.). En los ejemplos descritos a continuación en la sección de Ejemplos, las cepas varían con respecto a cualquiera de PorA o PorB, según se pone de manifiesto por su serotipo o serosubtipo. Las cepas también pueden variar con respecto a la molécula capsular, como refleja su serogrupo.

Actualmente, la clasificación del serotipo y serosubtipo se determina mediante la detección con un panel de anticuerpos monoclonales conocidos, que se sabe que reconocen moléculas específicas de Porina, que se unen a una cepa desconocida (Sacchi *et al.*, 1998, Clin. Diag. Lab. Immunol. 5: 348, véanse las Tablas 8 y 9 para listados parciales de anticuerpos monoclonales). Es probable que se identifiquen otros anticuerpos monoclonales. La invención contempla específicamente el uso de cualquiera de los nuevos serotipos y serosubtipos que pueden definir los nuevos anticuerpos monoclonales. Además, los serotipos y serosubtipos pueden definirse, no solo por la interacción con anticuerpos monoclonales, sino también estructuralmente por la ausencia y/o presencia de restos peptídicos y epítopos peptídicos definidos (Sacchi *et al.*, 2000, J. Infect. Dis. 182: 1169). La invención incluye específicamente esquemas de clasificación de serotipo y serosubtipo que se basan en características estructurales de las Porinas (conocidas o que pueden descubrirse en una fecha posterior).

Uno de los propósitos y efectos de la administración en serie de las composiciones antigénicas de diferentes cepas es potenciar una respuesta inmunitaria contra antígenos y epítopos que son generalmente no inmunodominantes, particularmente los epítopos no inmunodominantes que presentan menos variabilidad genética que los epítopos inmunodominantes conocidos. La invención incluye específicamente la administración en serie de composiciones

antigénicas de cepas de *Neisseria* que difieren con respecto a antígenos inmunodominantes distintos de las Porinas (por ejemplo, fosfolípidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, pilinas, OmpA, Opa, Opc, etc.).

5 Las composiciones antigénicas se administran generalmente a un mamífero que es inmunológicamente intacto con respecto a *Neisseria meningitidis*. En una realización particular, el mamífero es un niño de aproximadamente cinco años o más pequeño y preferentemente de aproximadamente dos años o más pequeño, y las composiciones antigénicas se administran a cualquiera de uno o más de los siguientes momentos: dos semanas, un mes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 meses, o un año o 15, 18 o 21 meses después del nacimiento, o a los 2, 3, 4 o 5 años de edad.

10 En general, la administración a cualquier mamífero se inicia preferentemente antes del primer indicio de los síntomas de enfermedad, o al primer indicio de una posible exposición o exposición real a *Neisseria*.

15 Cuando se identifican péptidos inmunogénicos particulares que dan lugar a inmunoprotección, como se ha descrito anteriormente y en lo sucesivo, estos antígenos pueden administrarse directamente en lugar de las MV o VME. Cuando los antígenos identificados son péptidos, el ADN que codifica uno o más de los péptidos de la invención también puede administrarse al paciente. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en Wolff *et al.*, Science 247: 1465-1468 (1990), así como en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.580.859 y 5.589.466.

20 3. Detección de antígenos inmunogénicos

25 Las fracciones subcelulares, tales como MV y VME, contienen muchos antígenos que pueden crear a una respuesta inmunitaria (véase, por ejemplo, la Figura 2 que representa un gel electroforético de diversas de dichas fracciones). Sin embargo, no todos los antígenos presentes en una preparación pueden provocar bien una respuesta humoral o inmunoprotección contra una enfermedad causada por una *Neisseria meningitidis* spp. Por lo tanto, en el presente documento también se describen antígenos individuales y/o combinaciones de antígenos que inducen inmunoprotección. Otro objetivo es el uso de los antígenos identificados para formular composiciones antigénicas que puedan utilizarse para provocar inmunoprotección contra una enfermedad de *Neisserial*.

30 Los antisueros o Acm se obtienen o se producen a partir de mamíferos que están inducidos por los métodos de la presente invención que presentan inmunoprotección contra una enfermedad causada por una *Neisseria meningitidis* spp.. Los antisueros o Acm se usan para detectar sus antígenos *Neisseriales* correspondientes y estos antígenos se identifican y aíslan según sus propiedades fisicoquímicas (clase de molécula: péptido, ácido nucleico, etc.; masa molecular, carga, composición química, etc.) o secuencia de aminoácidos. Los antígenos aislados (o partes inmunológicamente eficaces de los mismos) pueden después administrarse a mamíferos, individualmente y/o en combinación, como se ha descrito anteriormente, o como proteínas recombinantes (o fragmentos inmunológicamente eficaces de los mismos) para evaluar hasta qué nivel inducen inmunoprotección. En el presente documento también se describe la administración en serie de antígenos aislados de una cepa o de diferentes cepas de *Neisseria*, o la administración de dichos antígenos en una mezcla que comprende una o más, normalmente dos o más, más normalmente tres o más, incluso más normalmente de cuatro a seis o más antígenos.

40 Los antígenos *Neisseriales* ejemplares adecuados para la administración, tal y como se describe, pueden incluir, pero sin limitarse necesariamente, proteínas inmunoprecipitadas con antisueros producidos después de la vacunación con la vacuna CHORI, particularmente aquellas proteínas que tienen masas moleculares aparentes de aproximadamente 80 kDa, de aproximadamente 59,5 kDa, de aproximadamente 40,7 kDa, de aproximadamente 39,6 kDa, de aproximadamente 33 kDa, de aproximadamente 27,9 kDa, y de 14,5 kDa, o fragmentos antigénicos de las mismas. Los antígenos administrados pueden incluir al menos uno de estos antígenos, o pueden incluir una combinación de estos antígenos (por ejemplo, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o más).

50 Otros antígenos *Neisseriales* ejemplares, adecuados para la administración, tal y como se describe, pueden incluir, pero sin limitarse necesariamente, a aquellas proteínas detectadas por transferencia de Western con antisueros producidos después de la vacunación con la vacuna CHORI, en particular aquellas proteínas que tienen masas moleculares aparentes de aproximadamente 53-57 kDa; de aproximadamente 46-47 kDa, de aproximadamente 33 kDa, de aproximadamente 20 kDa a 21 kDa; y de aproximadamente 18 kDa, o fragmentos antigénicos de las mismas. Los antígenos administrados pueden incluir al menos uno de estos antígenos, o pueden incluir una combinación de estos antígenos (por ejemplo, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o más).

60 Cabe señalar que las referencias que se hacen a las masas moleculares de las proteínas se refieren a la masa molecular aparente determinada usando SDS-PAGE en las condiciones descritas. Será fácilmente obvio para el experto habitual en la materia, tras la lectura de la presente memoria descriptiva, que estas masas moleculares aparentes pueden variar para la misma proteína entre dos experimentos diferentes (por ejemplo, usando diferentes geles o diferentes preparaciones, cuando se aíslan de dos cepas diferentes (por ejemplo, debido a polimorfismos entre las cepas debido a sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos, a modificaciones postraduccionales y similares)) y además que diferentes proteínas pueden parecer tener la misma masa molecular aparente.

65

Los antígenos que provocan inmunoprotección se detectan por métodos conocidos, por ejemplo, inmunoensayo, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, transferencias de Western, etc. A continuación se describen ejemplos de dichos métodos.

5 (a) Detección de antígenos por inmunoensayo

Para caracterizar antisueros y anticuerpos específicamente inmunorreactivos con un antígeno o composición antigénica particular, y también para medir la fuerza de una respuesta inmunitaria contra un antígeno o composición antigénica particular, se usan diversos formatos de inmunoensayo. Generalmente, la primera etapa es la producción de antisuero o de una preparación de anticuerpos que se una al antígeno o a la composición antigénica.

(1) Producción de antisueros y anticuerpos policlonales o monoclonales específicos inmunitarios

Los expertos en la técnica conocen métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales usados en estos ensayos. Véase, por ejemplo, Coligan (1991), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; y Harlow y Lane (1989), ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, NY; Stites *et al.* (eds.) 1997 MEDICAL IMMUNOLOGY 9ª ed. McGraw-Hill Professional Publishing, Nueva York, NY, y referencias citadas en su interior; Goding (1986), MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY; y Kohler y Milstein (1975), Nature, 256: 495-497. Por ejemplo, para producir antisueros para su uso en un inmunoensayo, se proporciona una composición que contenga antígenos de *Neisseria meningitidis* spp., en solitario o mezclada con un adyuvante y se inyecta a un animal de elección (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo, cabra, vaca, caballo, pollo, etc.) de acuerdo con cualquiera de los protocolos descritos en el presente documento.

La respuesta inmunitaria del animal contra la preparación inmunogénica se comprueba tomando muestras de sangre y determinando la titulación de la reactividad de alícuotas diluidas en serie de suero frente a alícuotas diluidas en serie de la composición antigénica. Los antisueros policlonales con un título de 10^4 o mayor se seleccionan y se ensayan con respecto a su reactividad cruzada frente a controles no inmunogénicos, usando un inmunoensayo de unión competitiva. Los anticuerpos monoclonales y policlonales y los antisueros específicos se unirán normalmente con una constante de disociación (K_D) de al menos aproximadamente 0,1 mM, más normalmente al menos aproximadamente 1 μ M, preferentemente al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor y más preferentemente 0,01 μ M o mejor.

(2) Anticuerpos monoclonales

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales de diversos hospedadores mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. La descripción de técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales se encuentra, por ejemplo, en Stites *et al.* citado anteriormente, y referencias citadas en su interior; Harlow y Lane, citado anteriormente; Goding citado anteriormente; y Kohler y Milstein, citado anteriormente. Resumido brevemente, este método se realiza inyectando a un animal una composición inmunogénica. Después, el animal se sacrifica y se extraen células de su bazo, que se fusionan con células de mieloma. El resultado es una célula híbrida o "hibridoma" que puede reproducirse *in vitro*. La población de hibridomas se explora después para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una sola especie de anticuerpo contra el inmunógeno. De esta manera, la especie de anticuerpo individual obtenida son los productos de linfocitos B sencillos inmortalizados y clonados a partir del animal inmune generado en respuesta a un sitio específico reconocido en la sustancia inmunogénica.

Como métodos de inmortalización alternativos se incluyen, la transformación con el Virus del Epstein Barr, con oncogenes, o con retrovirus, u otros métodos conocidos en la técnica. Las colonias que surgen de células sencillas inmortalizadas se exploran con respecto a la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células se potencia mediante diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado (preferentemente un mamífero).

Otras técnicas adecuadas implican la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o similares (véase, por ejemplo, Huse *et al.* (1989) Science 246: 1275-1281; Ward *et al.* (1989) Nature 341: 544-546; y Vaughan *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 309-314).

(3) Inmunoensayos

Una vez que se obtiene un suero o un anticuerpo monoclonal inmunitario, que reconoce uno o más antígenos *Neisseriales*, este puede usarse para realizar inmunoensayos. Para una revisión general de procedimientos inmunológicos e inmunoensayos, véase D. Stites y A. Terr, (eds.), citado anteriormente. Además, los ensayos de la presente divulgación pueden realizarse en cualquiera de las diversas configuraciones revisadas ampliamente en ENZYME IMMUNOASSAY, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1980); "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, in LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR

BIOLOGY, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1985); y Harlow y Lane, citado anteriormente.

Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se utilizan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con un antígeno. Véase Harlow y Lane, citado anteriormente.

También se usan antisueros (o anticuerpos monoclonales) inmunoabsorbidos y/o agrupados en un inmunoensayo de unión directa o competitiva. Este último compara la unión de una segunda composición antigénica (por ejemplo las MV, las VME, los antígenos aislados o las composiciones antigénicas de una cepa *Neisserial* desconocida o conocida diferente) con la de la composición antigénica de referencia usada para provocar inmunoprotección. Para realizar esta comparación en el ensayo competitivo, cada una de las dos preparaciones antigénicas se ensaya a una amplia serie de concentraciones y se determina la cantidad de cada molécula necesaria para inhibir el 50 % de la unión de los antisueros con la preparación antigénica de referencia inmovilizada. Si la cantidad necesaria de la segunda proteína es menor de 10 veces la cantidad del péptido de referencia utilizado para preparar el anticuerpo, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a un anticuerpo generado por la preparación antigénica de referencia.

(b) Transferencias de Western

Generalmente, el análisis de transferencia de Western comprende la separación de los productos de la muestra mediante electroforesis en gel según el peso molecular, la transferencia de las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nylon o un filtro de nylon derivatizado) e incubar la muestra con anticuerpos marcadores que se unen específicamente a la proteína analito. Los anticuerpos marcadores se unen específicamente al analito en el soporte sólido. Estos anticuerpos se marcan directamente, o como alternativa, se detectan posteriormente usando agentes marcadores, tales como anticuerpos (por ejemplo anticuerpos de cabra anti-ratón marcados, donde el anticuerpo contra un analito es un anticuerpo murino) que se unen específicamente al anticuerpo marcador.

4. Purificación de antígenos inmunogénicos

Los antígenos pueden aislarse (separarse de una o más moléculas con las que el antígeno está asociado *in vivo*) y purificarse (un antígeno purificado, por ejemplo, una proteína, presenta preferentemente de manera esencial una sola banda en un gel electroforético para cada subunidad del antígeno disociable) y se usan para provocar inmunoprotección.

Los antígenos individuales, especialmente proteínas y fragmentos peptídicos de las mismas, pueden purificarse mediante cualquiera de diversas técnicas conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico o de inmunofinidad, separación por tamaño, o electroforesis (véase, en general, Scopes, R. Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y. (1982)). Por ejemplo, los antígenos de *Neisseria meningitidis* spp. reconocidos por antisueros de amplio espectro, obtenidos después de inyecciones en serie de las VME y/o MV obtenidas a partir de diferentes especies de *Neisseria meningitidis*, se obtienen utilizando antisueros de amplio espectro para generar preparaciones antigénicas enriquecidas. También pueden prepararse antígenos aislados inmunoprecipitando una fracción obtenida a partir de *Neisseria meningitidis* spp. Los antígenos también pueden aislarse conjugando antisueros o anticuerpos monoclonales inmunitarios con una columna y realizando cromatografía de afinidad. La fuente de los antígenos puede ser un lisado de células enteras obtenido por métodos conocidos, por ejemplo, por ultrasonido, o como alternativa, por exposición a un detergente iónico o no iónico, o la fuente puede ser las MV o VME de una cepa *Neisserial*.

5. Antígenos peptídicos

Adicionalmente, una vez establecida la identidad de los antígenos de proteína y/o epítopes peptídicos específicos, pueden generarse preparaciones antigénicas de *Neisseria meningitidis* spp., adecuadas para inducir inmunoprotección, por síntesis peptídica mediante técnicas convencionales e inyectar las preparaciones peptídicas sintéticas a un mamífero. Las técnicas para realizar la síntesis peptídica son muy conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Rockford, Ill., Pierce), 2ª Ed. (1984) y Kent, 1988, Annu. Rev. Biochem. 57: 957.

Como alternativa, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido particular se pueden clonar y expresar para proporcionar el péptido. Pueden utilizarse técnicas convencionales para obtener y explorar bibliotecas de ácidos nucleicos para identificar secuencias que codifiquen las secuencias deseadas (véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) o pueden sintetizarse ácidos nucleicos que codifiquen péptidos deseados por métodos conocidos. Las proteínas de fusión (aquellas que consisten en la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos de dos o más proteínas) pueden producirse de forma recombinante. Además, usando técnicas de mutagénesis *in vitro*, pueden mutarse proteínas no relacionadas que comprendan las secuencias apropiadas.

Se entenderá que los antígenos inmunogénicos pueden modificarse para proporcionar diversos atributos deseados, por ejemplo, características farmacológicas mejoradas, al tiempo que aumenta o al menos conservando sustancialmente toda la actividad biológica del péptido no modificado. Por ejemplo, los péptidos pueden modificarse ampliando, reduciendo la secuencia de aminoácidos del péptido. También pueden realizarse sustituciones con diferentes aminoácidos o miméticos de aminoácidos.

Los péptidos empleados no tienen que ser idénticos a los desvelados en la sección de Ejemplos, más adelante, (por ejemplo, con respecto al peso molecular), siempre que los péptidos en cuestión sean capaces de inducir una respuesta inmunitaria contra la molécula antigénica deseada. Por lo tanto, un experto reconocerá que pueden realizarse diversas sustituciones conservativas (descritas más adelante con más detalle), sin afectar sustancialmente a la actividad del péptido.

Para determinar qué restos son relativamente insensibles a modificación, pueden usarse sustituciones, deleciones e inserciones de un solo aminoácido. Las sustituciones se realizan preferentemente con grupos pequeños, relativamente neutros, tales como Ala, Gly, Pro o restos similares. El efecto de las sustituciones de un solo aminoácido también puede explorarse utilizando D aminoácidos. Los números y tipos de restos que están sustituidos o añadidos dependen de la distancia necesaria entre puntos de contacto esenciales y determinados atributos funcionales que se persiguen (por ejemplo, hidrofobia frente a hidrofilia). El aumento de la inmunogenicidad también puede realizarse mediante dichas sustituciones, en comparación con el péptido parental. En cualquier caso, dichas sustituciones deben emplear restos de aminoácidos u otros fragmentos moleculares seleccionados para impedir, por ejemplo, la interferencia estérica y de carga que podría alterar la unión.

Sin embargo, los aminoácidos que se sustituyen no se limitan necesariamente a los que se producen de modo natural en las proteínas, tales como L- α -aminoácidos, o sus D-isómeros. Los péptidos pueden sustituirse con diversos residuos, tales como miméticos de aminoácidos, bien conocidos por los expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.030.619).

En el péptido pueden incorporarse restos individuales de los polipéptidos antigénicos inmunogénicos mediante un enlace peptídico o mimético de enlace peptídico. Un mimético de enlace peptídico de la divulgación incluye modificaciones en la cadena principal peptídica bien conocidas por los expertos en la técnica. Dichas modificaciones incluyen modificaciones del nitrógeno de amida, del carbono α , carbonil amida, la sustitución completa del enlace amida, extensiones o deleciones o entrecruzamientos de la cadena principal. Véase, en líneas generales, Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. VII (Weinstein ed., 1983). Se conocen diversas modificaciones de la cadena principal peptídica. Estas incluyen ψ [CH₂S], ψ [CH₂NH], ψ [CSNH₂], ψ [NHCO], ψ [COCH₂] y ψ [(E) o (Z) CH=CH]. La nomenclatura usada anteriormente sigue la sugerida por Spatola en la bibliografía anterior. En este contexto, ψ indica la ausencia de un enlace amida. La estructura que reemplaza el grupo amida se especifica entre corchete.

Los miméticos de aminoácidos también pueden incorporarse en los péptidos. Un "mimético de aminoácido", como se usa en el presente documento, es un residuo distinto de un aminoácido de origen natural que actúa conformacional y funcionalmente como un sustituto para un aminoácido en un polipéptido de la presente divulgación. Dicho residuo actúa como un sustituto para un resto de aminoácido si no interfiere con la capacidad del péptido para provocar una respuesta inmunitaria contra el antígeno apropiado. Los miméticos de aminoácidos pueden incluir aminoácidos no proteicos, tales como β - γ - δ aminoácidos, β - γ - δ -iminoácidos (tales como ácido piperidin-4-carboxílico), así como muchos derivados de L- α -aminoácidos. El experto en la técnica conoce diversos miméticos de aminoácidos; estos incluyen ciclohexilalanina, ácido 3-ciclohexilpropiónico, L-adamantil alanina, ácido adamantil acético y similares. Los péptidomiméticos adecuados para los péptidos de la presente divulgación se analizan en Morgan y Gainor, (1989) Ann. Repts. Med. Chem. 24: 243-2526.

Como se ha indicado anteriormente, los péptidos empleados no tienen que ser idénticos, sino que pueden ser sustancialmente idénticos, a la secuencia correspondiente del antígeno diana. Por lo tanto, los péptidos pueden someterse a diversos cambios, tales como inserciones, deleciones y sustituciones, bien conservativas o no conservativas, donde dichos cambios proporcionarían diversas ventajas en su uso. Los polipéptidos de la divulgación pueden modificarse de diversas maneras siempre que comprendan una secuencia sustancialmente idéntica (como se define más adelante) a una secuencia en la región diana del antígeno.

Generalmente el alineamiento y la comparación de secuencias de aminoácidos relativamente cortas (menos de aproximadamente 30 restos) es generalmente sencillo. La comparación de secuencias más largas puede requerir métodos más sofisticados para lograr el alineamiento óptimo de dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, con el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, con la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444, con implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que da como resultado el mayor

porcentaje de similitud de secuencia sobre la ventana de comparación) generado por los diversos métodos.

Las expresiones “identidad” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

La frase “sustancialmente idénticos”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de restos de aminoácidos o de polinucleótidos de al menos 60 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 90-95 %, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial existe sobre una región de las secuencias que tiene una longitud al menos aproximadamente 50 restos, más preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 100 restos y más preferentemente las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 restos. En una realización más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre toda la longitud de las regiones codificantes.

Para la comparación de secuencias, generalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se especifican coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se especifican los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula después el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia(s) de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros especificados del programa.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), con el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), con la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), con implantaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase, en líneas generales, *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley y Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 que se describen en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y en Altschul *et al.* (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, respectivamente. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coinciden o cumplen con alguna puntuación de umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de bases de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, citado anteriormente).

Estos aciertos de palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP más largos que los contienen. Después, los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en cuanto a la puntuación de alineamiento acumulativa que puede aumentar. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza al final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST (para secuencias de nucleótidos) usa, por defecto, una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01, y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es, en general, sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo en sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación.

Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufres cisteína y metionina. Son grupos preferidos de sustituciones conservativas de aminoácidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

Los polipéptidos divulgados incluidos en la divulgación comprenden generalmente al menos aproximadamente 10 restos y más preferentemente al menos aproximadamente 15 restos, preferentemente de un dominio del antígeno que se expone al sistema inmunitario. En determinadas realizaciones, los péptidos no superarán aproximadamente 50 restos y generalmente no superarán aproximadamente 30 restos.

Los péptidos inmunogénicos son conformacionalmente restringidos. Los medios para lograr esto son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hruby y Bonner in *Methods in Molecular Biology*, volumen 35: *Peptide Synthesis Protocols*, Pennington y Dunn eds (Humana Press, Totowa, NJ, 1994). Un medio preferido para preparar péptidos conformacionalmente restringidos es a través de la ciclación. Para producir los péptidos de la invención puede usarse cualquier método normalmente usado para producir oligopéptidos ciclados. Por ejemplo, en determinadas realizaciones los péptidos incluirán restos de cisteína en ambos extremos, lo que permite la producción de péptidos cíclicos a través de enlaces disulfuro. El tratamiento de dicho péptido con un agente oxidante, tal como oxígeno, yodo o agente similar, producirá un péptido cíclico que se puede purificar adicionalmente usando cromatografía u otros métodos de purificación química. La construcción de péptidos cíclicos también puede realizarse a través de enlaces tioéter. Por ejemplo, los péptidos N-bromoacetil derivatizados pueden reaccionar con restos que contienen sulfhidrilo, tales como cisteína. La ciclación se produce por reacción del sulfhidrilo de cisteína libre en el péptido con el grupo bromoacetilo para formar un enlace tioéter (Robey *et al.*, *Anal. Biochem.* 177: 373-7 (1989) y Patente de Estados Unidos N° 5.066.716).

Los expertos en la técnica conocen otros métodos de construcción de péptidos cíclicos. Estos incluyen ciclaciones de cadena lateral-cadena lateral, cadena lateral-cadena principal y cadena principal-cadena principal. Además, pueden utilizarse engarces para unir el extremo amino y carboxilo de un péptido. El engarce puede formar enlaces covalentes tanto en el extremo amino como en el carboxilo. Los expertos en la técnica conocen bien engarces adecuados e incluyen, sin limitación, engarces de carbono de cadena lineal o ramificada, engarces de carbono heterocíclico o engarces peptídicos. Los engarces pueden unirse a los aminoácidos carboxilo y amino terminales a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro con cisteína) o a través de los grupos carboxilo y amino del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

Para un análisis general de métodos adecuados para la ciclación, véase Hruby y Bonner in *Methods in Molecular Biology*, volumen 35: *Peptide Synthesis Protocols*, Pennington y Dunn eds (Humana Press, Totowa, NJ, 1994). Por ejemplo, las ciclaciones pueden incluir la formación de análogos carba y tioéteres (Lebl *et al.* en *Peptides 1986 Proceedings of the 19th European Peptide Symposium* pp. 341-344; Robey *et al.*, *Anal. Biochem.* 177: 373-7 (1989) y Patente de Estados Unidos 5.066.716), bistioéteres (Mosberg *et al.* *JACS* 107: 2986-2987 (1985)), azopéptidos (Siemion *et al.* *Mol. Cell. Biochem.* 34: (1991)), y otras estructuras cíclicas, tales como estructuras formadoras de puentes (Charpentier, M., *et al.*, *J. Med. Chem.* 32(6): 1184-1190 (1989), Thaisrivongs, S., *et al.*, *J. Med. Chem.* 34(4): 127 (1991) y Ozeki, E., *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.* 34: 111 (1989)). También puede usarse la ciclación de posiciones cadena principal-cadena principal.

La formación de puentes es un tipo especial de ciclación en el que usando moléculas o fragmentos formadores de puentes distintos se unen sitios distantes en un péptido. Las moléculas formadoras de puentes pueden incluir, por ejemplo, moléculas de anhídrido succínico (Charpentier, B., *et al.*, citado anteriormente) y fragmentos de carboximetileno (Thaisrivongs, S., *et al.*, citado anteriormente). La formación de puentes por metales también puede usarse (Ozeki, E., *et al.*, citado anteriormente).

En algunos aspectos, los péptidos incluyen dos o más restos de cisteína. Las cisteínas pueden estar sustituidas o pueden añadirse al péptido o en cualquier extremo. La posición de las cisteínas no es crítica siempre que puedan formarse enlaces disulfuro entre ellas para permitir la producción de péptidos cíclicos. Por ejemplo, el tratamiento de dicho péptido con un agente oxidante tal como oxígeno, yodo o agente similar producirá un péptido cíclico que

pueda purificarse adicionalmente usando cromatografía u otros métodos de purificación química.

Otros aspectos incluyen péptidos que contienen secuencias antigénicas de secuencias de proteínas que se han incorporado en péptidos que se pliegan independientemente (Regan y DeGrado, 1988, *Science* 241: 976; Mutter, 1988, *TIBS* 13: 260; Kamtekar *et al.*, 1993, *Science* 262: 1680; Sieber y Moe, 1996, *Biochemistry* 35: 181; Butcher y Moe, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1135; FitzGerald *et al.*, 1998, *Biochemistry* 273: 9951). Los péptidos que se pliegan independientemente pueden ser de origen natural o diseñarse de nuevo.

También podrían obtenerse péptidos capaces de provocar inmunoprotección similares a los de la vacuna CHORI usando anticuerpos monoclonales producidos por inmunización con antígenos CHORI o similar para seleccionar miméticos moleculares de bibliotecas de péptidos de presentación de fagos u otras bibliotecas combinatorias tales como moléculas pequeñas o ácidos nucleicos.

Además del uso de péptidos, los anticuerpos generados contra los péptidos de la divulgación pueden usarse para inhibir respuestas inflamatorias. Pueden generarse anticuerpos contra los péptidos de la presente divulgación utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. También pueden generarse anticuerpos anti-idiotípicos. La descripción presenta una revisión general de las técnicas disponibles; sin embargo, un experto reconocerá que se conocen muchas variaciones sobre los métodos siguientes.

Con frecuencia, los péptidos y anticuerpos de la divulgación se marcarán uniéndose, por enlace covalente o no covalente, con una sustancia que proporcione una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se ha publicado ampliamente tanto en la bibliografía científica como de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, residuos fluorescentes, residuos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen las Patentes de Estados Unidos Nos 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241. Además pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes. Véase Cabilly, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Queen *et al.* (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033.

6. Inmunidad pasiva

Los anticuerpos inmunoprotectores que reconocen epítopes *Neisseriales* también pueden administrarse a un organismo (por ejemplo, a un paciente humano) para inducir inmunidad pasiva contra una enfermedad *Neisserial*, para impedir que se produzcan infecciones o enfermedades, o como una terapia para mejorar el resultado clínico en pacientes con enfermedades establecidas (por ejemplo, índice de complicación disminuido tal como choque, tasa de mortalidad disminuida, o morbilidad disminuida, tal como la sordera).

Frecuentemente, los anticuerpos que se administran a un organismo distinto de la especie en la que se genera son inmunogénicos. De esta manera, por ejemplo, anticuerpos murinos o porcinos administrados a un ser humano a menudo inducirán una respuesta inmunológica contra el anticuerpo. Las propiedades inmunogénicas del anticuerpo se reducen alterando partes del anticuerpo, o todo el anticuerpo, en secuencias característicamente humanas, produciendo así anticuerpos quiméricos o humanos, respectivamente.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina que comprenden una parte no humana y una parte humana. Más específicamente, la región de combinación del antígeno (o región variable) de un anticuerpo quimérico humanizado procede de una fuente no humana (por ejemplo, murina), y la región constante del anticuerpo quimérico (que confiere la función efectora biológica a la inmunoglobulina) procede de una fuente humana. El anticuerpo quimérico debería tener la especificidad de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo no humana y la función efectora conferida por la molécula de anticuerpo humano. Los expertos en la técnica conocen bien una gran cantidad de métodos para la generación de anticuerpos quiméricos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.502.167, 5.500.362, 5.491.088, 5.482.856, 5.472.693, 5.354.847, 5.292.867, 5.231.026, 5.204.244, 5.202.238, 5.169.939, 5.081.235, 5.075.431 y 4.975.369). Una estrategia alternativa es la generación de anticuerpos inmunizados uniendo regiones CDR de anticuerpos no humanos con regiones constantes humanas mediante técnicas de ADN recombinantes. Véase Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989) y el documento WO 90/07861.

En un aspecto preferido, el vector de ADN recombinante se usa para transfectar una línea celular que produce un anticuerpo contra un péptido de la divulgación. El nuevo vector de ADN recombinante que contiene un "gen de reemplazo" para reemplazar toda o una parte del gen que codifica la región constante de inmunoglobulina en la línea celular (por ejemplo, un gen de reemplazo puede codificar toda o una parte de una región constante de una inmunoglobulina humana, o una clase específica de inmunoglobulina) y una "secuencia diana", que permite la recombinación homóloga dirigida con secuencias de inmunoglobulina dentro de la célula productora de anticuerpos.

En otro aspecto, se usa un vector de ADN recombinante para transfectar una línea celular que produce un anticuerpo que tiene una función efectora deseada (por ejemplo, una región constante de una inmunoglobulina humana), en cuyo caso, el gen de reemplazo contenido en el vector recombinante puede codificar toda o una parte de una región de un anticuerpo y la secuencia diana contenida en el vector recombinante permite la recombinación

homóloga y la modificación génica dirigida dentro de la célula productora de anticuerpos. En cualquier aspecto, cuando se reemplaza solo una parte de la región variable o constante, el anticuerpo quimérico resultante puede definir el mismo antígeno y/o tener la misma función efectora todavía alterada o mejorada de forma que el anticuerpo quimérico pueda demostrar una mayor especificidad antigénica, una mayor constante de afinidad de unión, una función efectora incrementada, o un aumento de la secreción y producción por la línea celular productora del anticuerpo transfectado, etc.

En otro aspecto, en el presente documento se describen anticuerpos completamente humanos. Los anticuerpos humanos constan en su totalidad de secuencias polipeptídicas característicamente humanas. Los anticuerpos humanos de esta divulgación pueden producirse mediante una amplia diversidad de métodos (véase, por ejemplo, Larrick *et al.*, Patente de Estados Unidos N^o 5.001.065). En un aspecto, los anticuerpos humanos de la presente divulgación se producen inicialmente en células de trioma (que descienden de tres células, dos humanas y una de ratón). Después, los genes que codifican los anticuerpos se clonan y expresan en otras células, particularmente en células de mamíferos no humanos. La estrategia general para producir anticuerpos humanos mediante tecnología de trioma la han descrito Ostberg *et al.* (1983), Hybridoma 2: 361-367, Ostberg, Patente de Estados Unidos N^o 4.634.664, y Engelman *et al.*, Patente de Estados Unidos N^o 4.634.666. Se ha descubierto que los triomas producen anticuerpos más estables que los hibridomas habituales preparados a partir de células humanas.

En la técnica se conocen bien métodos para producir y formular anticuerpos adecuados para la administración a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano). Por ejemplo, los anticuerpos pueden proporcionarse en una composición farmacéutica que comprenda una cantidad eficaz de un anticuerpo y excipientes farmacéuticos (por ejemplo, solución salina). La composición farmacéutica puede incluir opcionalmente otros aditivos (por ejemplo, tampones, estabilizantes, conservantes y similares). Una cantidad eficaz de anticuerpo es generalmente una cantidad eficaz para proporcionar protección contra enfermedades o síntomas *Neisseriales* durante un periodo de tiempo deseado, por ejemplo, un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 2 días a 10 días o 1 mes a 2 meses).

7. Ensayos de diagnóstico

Los antígenos o anticuerpos de la divulgación también pueden usarse con fines diagnósticos. Por ejemplo, los péptidos pueden usarse para explorar sueros pre-inmunes e inmunes para asegurar que la vacunación ha sido eficaz. Los anticuerpos también pueden usarse en inmunoensayos para detectar la presencia de moléculas antigénicas particulares asociadas con enfermedades *Neisseriales*.

Ejemplos

Los ejemplos y realizaciones descritos en este documento ilustran la invención.

A. Preparaciones de membrana

Se seleccionaron cepas para la preparación de VME y MV basándose en el serogrupo, serotipo y serosubtipo. Las cepas a usar en la preparación de las MV se seleccionaron para niveles relativamente altos de formación de ampollas y expresión de NspA (véase Moe *et al.* (1999 Infect. Immun. 67: 5664). Las cepas ejemplares usadas en la preparación de VME y MV se han depositado en la American Type Culture Collection (ATCC; véase más adelante). Las cepas que producen altos niveles de ampollas, que son cepas particularmente útiles en la producción de MV, pueden seleccionarse o son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 01/34642).

La cepa meningocócica congelada a -80 °C en leche desnatada acuosa -2 % (p/v) se subcultivó en una placa de agar-chocolate comercial (Remel, Lantana, KS). Después de una noche de cultivo a 37 °C en O₂ al 4 %, se seleccionaron diversas colonias para inocular ~7 ml de caldo estéril Mueller-Hinton a una DO_{620nm} de 0,1. El cultivo se incubó a 37 °C, CO₂ al 4 % con balanceo hasta que la DO_{620nm} alcanzó 0,6-0,8 (dos a tres horas). Después, se usaron de dos a tres cultivos iniciadores de 7 ml para inocular 500 ml de caldo de Mueller-Hinton. El cultivo más grande se desarrolló a una DO_{620nm} de 0,9-1,0 a 37 °C con agitación enérgica. Se añadió fenol al cultivo a una concentración final de 0,5 % (p/v) y la mezcla se dejó a 4 °C durante una noche para inactivar las bacterias. Después, las células se sedimentaron por centrifugación (11.000 x g) durante 30 minutos a 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron a -20 °C hasta su uso para la preparación de vesículas de proteínas de membrana externa (VME).

Las microvesículas (MV) se recogieron del sobrenadante del cultivo celular tratado con fenol añadiendo sulfato de amonio sólido (concentración final 390 g/l) lentamente con agitación. Después de añadir el sulfato de amonio y disolver por completo, la mezcla se dejó a 4 °C durante una noche. Las MV precipitadas se recogieron después por centrifugación a 11.000 x g durante 30 minutos. El sedimento de MV precipitado se resuspendió en un volumen de 0,04 de PBS y de nuevo se centrifugó a 16.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sedimento se desechó y las MV, que permanecían en el sobrenadante, se recogieron por centrifugación a 100.000 x g durante 2 horas a 4 °C. El sedimento final se resuspendió en un volumen de agua de 0,01 (es decir 5 ml por 500 ml de cultivo) (preparación de vacuna "MV"). Como alternativa, el sedimento se resuspendió en Tris•HCl 0,1 M, pH 8,6, que contenía EDTA 10 mM y desoxicolato sódico al 0,5 % (p/v) (cultivo celular ~3 ml/500 ml). Después de agitar (30 min), la mezcla se

centrifugó (125.000 x g, 2 horas, 4 °C). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 1 ml de sacarosa al 3 % (preparación de vacuna "MV DOC"). La concentración de proteína de las preparaciones de MV y MV DOC se determinó mediante ensayo BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Las suspensiones de MV y MV DOC se congelaron después en hielo seco y se conservaron a -20 °C hasta su uso para la inmunización.

Las vesículas de membrana externa (VME) se prepararon por el método de Zollinger *et al.* (1979 J. Clin. Invest. 63: 836-848). El sedimento celular congelado se resuspendió en 10 ml de tampón Tris•HCl 0,05 M, pH 7,4 que contenía NaCl 0,15 M y EDTA 0,01 M, después se calentó a 56 °C durante 30 minutos, seguido de enfriamiento en hielo. La suspensión de células se sometió después a ultrasonido en hielo con diversas ráfagas de 15 segundos usando un sonificador de microsondas (Branson, Danbury, CT). Los desechos celulares se eliminaron por centrifugación a 16.000 x g durante 15 minutos y las vesículas de membrana externa (VME) en el sobrenadante se obtuvieron por ultracentrifugación a 100.000 x g durante 2 horas a 4 °C. El sedimento de VME se resuspendió en 2 ml de agua (preparación de vacuna "VME"). Como alternativa, el sedimento celular congelado se resuspendió en Tris•HCl 0,1 M, pH 8,6, que contenía EDTA 10 mM y desoxicolato sódico al 0,5 % (p/v). Después de agitar durante 30 minutos, a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó (20.000 x g, 30 min, 4 °C). El sobrenadante se conservó y el sedimento se volvió a extraer y se centrifugó de nuevo con un tercio del volumen del mismo tampón. Los sobrenadantes de ambas extracciones se combinaron y se centrifugó (125.000 x g, 2 horas, 4 °C). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 5 ml de sacarosa al 3 % (preparación de vacuna "VME DOC"). Las preparaciones de vacunas VME y VME DOC se congelaron en hielo seco y se conservaron a -20 °C hasta su uso para la inmunización. La concentración de proteína de las preparaciones VME y VME DOC se determinaron mediante ensayo BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

B. Programa de inmunización

Las preparaciones de MV o VME se diluyeron en PBS y bien se mezclaron con un mismo volumen de adyuvante completo de Freund (CFA; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) o de hidróxido de aluminio (Alhidrogel al 1,3 % a partir de Superfos Biosector, Frederikssund, Dinamarca) o fosfato de aluminio (Alhidrogel que se había incubado con tampón PBS durante al menos 3 horas). En algunas preparaciones de vacunas, se añadieron nucleótidos CpG (5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3' (SEC ID N°: 1) Chiron Corp., Emeryville, CA) a la mezcla de fosfato de aluminio/antígeno a una concentración final de 100 µg/ml como un segundo adyuvante. Los ratones se inmunizaron por vía IP (CFA) o SC (fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio) con 100 µl que contenía entre 5 a 25 microgramos de proteína total de la MV preparada a partir de la cepa meningocócica RM1090. A intervalos de 3 a 4 semanas se administraron dos dosis de refuerzo posteriores (5-25 microgramos/ratón) con adyuvante incompleto de Freund (IFA), o hidróxido de aluminio, o fosfato de aluminio (preparado como se ha descrito anteriormente) por vía IP o SC, respectivamente, de las primeras MV preparadas a partir de la cepa meningocócica BZ198 y después las VME preparadas a partir de la cepa meningocócica Z1092. La inmunización secuencial con tres cepas meningocócicas diferentes, que eran genéticamente diferentes con respecto a su serogrupo, serotipo, serosubtipo y otros antígenos, constituye lo que en este documento, en lo sucesivo, se denomina "vacuna CHORI". En un segundo experimento, se inmunizó a otro grupo de ratones con la vacuna CHORI como se describe anteriormente, excepto que no se usaron oligonucleótidos CpG como segundo adyuvante y que el experimento incluyó ratones que recibieron la vacuna CHORI combinada con adyuvante de hidróxido de aluminio y que los ratones que recibieron tres inyecciones de una mezcla de la MV/VME descrita anteriormente junto con fosfato de aluminio. En un tercer experimento, grupos de cobayas recibieron bien inmunizaciones secuenciales con antígenos de la vacuna CHORI o tres inyecciones de una mezcla de antígenos de la vacuna CHORI combinado con fosfato de aluminio.

C. SDS-PAGE y transferencias de Western

Las preparaciones de proteínas se analizaron usando SDS-PAGE 15 % como describe Laemmli (1970 Nature 227: 680-685) empleando un aparato de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad, Richmond, CA). Las muestras se suspendieron en tampón de muestra SDS (Tris•HCl 0,06, pH 6,0, glicerol al 10 % (v/v), 2-mercaptoetanol al 5 % (v/v), azul de bromofenol 10 microgramos/ml) y se calentó opcionalmente a 100 °C durante 1 minuto antes de cargar directamente sobre el gel.

La Figura 2 muestra un gel de SDS-PAGE al 15% teñido con Coomassie de las proteínas presentes en las preparaciones de MV de la cepa Z1092 (carril 2) o de VME de la cepa Z1092 (carril 4), o las preparaciones respectivas después de haberse extraído con desoxicolato sódico al 0,5 % (p/v) (es decir MV DOC [carril 3] y VME DOC [carril 5] como describen Fredricksen *et al.* (1991, NIPH Ann. 14: 67-79). Las cuatro preparaciones correspondientes se elaboraron a partir de las cepas meningocócicas BZ198 y RM1090 (mostradas en los carriles 6 a 13, respectivamente). Se sabe que cinco proteínas, PorA, PorB, Rmp, Opa y Opc, constituyen las principales proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*. Todas las preparaciones parecen contener las principales proteínas de membrana externa PorA y PorB (~39-42 kDa) y las proteínas de opacidad, Opa y Opc (~28-31 kDa), aunque la masa aparente de las proteínas particulares y las cantidades relativas fueron diferentes en cada preparación. La proteína menos distinta que tiene una masa aparente de ~31-34 kDa en las preparaciones VME DOC pueden ser proteínas modificables por reducción (Rmp). Además de estas proteínas de membrana externa principales, cada preparación MV y VME contiene diversas otras proteínas en menores cantidades. En general, las

proteínas minoritarias son más variables entre cepas y entre preparaciones MV en comparación con VME.

D. Unión de anticuerpos a la superficie celular

5 La unión de anticuerpos a la superficie de bacterias vivas se determinó por citometría de flujo con fluorescencia indirecta (Granoff *et al.*, 1998, J. Immunol. 160: 5028-5036). Las células bacterianas se cultivaron hasta la fase semilogarítmica en caldo de Mueller-Hinton, se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de bloqueo (PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % (p/v) y azida sódica al 0,4 % (p/v)) a una densidad de $\sim 10^8$ células por ml. Después, se añadieron diluciones de antisuero de ensayo o de control (generalmente 1:20, 1:200, 1:2000) y se permitió la unión a las células, que se mantuvieron en hielo durante 2 horas. Después de dos lavados con tampón de bloqueo, las células se incubaron con IgG de cabra anti-ratón fragmento F(ab')₂ conjugado con FITC (H+L) (Jackson Immune Research, West Grove, PA) durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con tampón de bloqueo y después se hicieron reaccionar con formaldehído al 0,25 % solo en tampón PBS antes de analizar las células bacterianas por citometría de flujo.

15 Los anticuerpos de control positivo incluían anticuerpos monoclonales de serotipificación o serosubtipificación específica meningocócica (MN2C3B, MN16C13F4, Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, Países Bajos) y SEAM 12, un anticuerpo monoclonal anti-polisacárido que es específico para cepas del serogrupo B encapsuladas (Granoff *et al.*, 1998, J. Immunol. 160: 5028). El control negativo consistió en un anticuerpo monoclonal de IgG de ratón (VIG10) de especificidad irrelevante y sueros policlonales de ratones inmunizados con proteínas de membrana de *E. coli*. Los anticuerpos usados para definir el serogrupo, el serotipo y el serosubtipo se proporcionan en las Figuras 20 y 21.

25 La Figura 3 muestra los resultados de un experimento típico que examina la unión de anticuerpos a dos cepas de ensayo: MC58 y S3446. Ambas cepas expresan las proteínas PorA y PorB que son heterólogas a las proteínas de porina respectivas de las tres cepas usadas para preparar la vacuna CHORI. Los antisueros de ratones inmunizados con el antígeno CHORI muestran un aumento en la intensidad de fluorescencia con ambas cepas cuando los antisueros se ensayaron a diluciones de 1:20 a 1:200. Por otro lado, los antisueros policlonales preparados para proteínas precipitadas del sobrenadante de cultivo de *E. coli* muestran solo una fluorescencia de fondo de baja intensidad (dilución 1:20) y se consideraron negativos. Los antisueros de cobayas inmunizadas con la vacuna Noruega, preparada a partir de VME de la cepa H44/76 (P1.7,16), fueron positivos para la cepa MC58 con un serosubtipo PorA homólogo (P1.7,16) pero negativos cuando se ensayaban a una dilución 1:20 contra la cepa S3446 con un serosubtipo heterólogo (P1.22,14).

35 Como se resume en la Figura 4, de las 12 cepas del serogrupo B de *N. meningitidis* ensayadas por citometría de flujo, 11 (92 %), incluyendo 6 cepas con serosubtipos PorA heterólogos y 3 cepas que tenían tanto serotipos como serosubtipos heterólogos, fueron positivas para la unión a la superficie celular por antisueros antigénicos anti-CHORI. La cepa negativa no expresa PorA, lo que sugiere que algunos de los anticuerpos de la vacuna anti-CHORI se unen a PorA o a proteínas cuya expresión puede regularse junto con la expresión de PorA. Además de las 11 cepas meningocócicas B, los antisueros de la vacuna anti-CHORI fueron también positivos en este ensayo cuando se ensayaron con cepas meningocócicas heterólogas de serogrupo A (Z1073) y C (60E) (Figura 5).

E. Actividad bactericida de anticuerpos dependiente de complemento.

45 El ensayo bactericida se adaptó a partir del método previamente descrito por Mandrell *et al.* (1995 J. Infect. Dis. 172: 1279-1289). El hallazgo de que una vacuna produce anticuerpos bactericidas en contra *Neisseria meningitidis* es aceptado en el campo como indicador del efecto protector de la vacuna en seres humanos (Goldschneider *et al.*, 1969, J. Exp. Med. 129: 1307; Borrow *et al.* 2001 Infect Immun. 69: 1568). Después del cultivo durante una noche en agar chocolate, varias colonias se inocularon en caldo de Mueller-Hinton (A_{620nm} de partida de $\sim 0,1$) y el organismo de ensayo se cultivó durante aproximadamente 2 horas a una A_{620nm} de $\sim 0,6$. Después de lavar las bacterias dos veces en tampón de Gey que contenía BSA al 1 % (p/v), se añadieron aproximadamente de 300 a 400 unidades formadoras de colonias (UFC) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción final de 60 microlitros contenía 20 % (v/v) de complemento y diluciones en serie con factor 2 de sueros de ensayo o anticuerpos monoclonales control en el tampón de Gey. La fuente de complemento era suero humano de un adulto sano sin anticuerpo anticapsular detectable contra polisacárido de serogrupo B cuando se ensaya por ELISA (Granoff *et al.*, 1998, J. Immunol. 160: 5028-5036) y sin actividad bactericida intrínseca detectable contra la cepa de ensayo a una concentración final de 20 o 40 %. En experimentos preliminares con un panel de sueros de ensayo, esta fuente de complemento produjo títulos bactericidas comparables a los obtenidos con el suero agammaglobulinémico como fuente de complemento. Se definieron títulos bactericidas en suero como la dilución de suero (o concentración de anticuerpos) que da como resultado una disminución del 50 % en las UFC por ml después de 60 minutos de incubación de bacterias en la mezcla de reacción, en comparación con las UFC control por ml en el momento 0. En general, las bacterias incubadas con anticuerpo de control negativo y complemento mostraron un aumento del 150 al 200 % en UFC/ml durante los 60 minutos de incubación. La Figura 6 muestra los datos de un experimento típico con la cepa meningocócica B 2996 ensayada con un Acm anti-capsular de meningococo B (SEAM 12, Granoff *et al.*, 1998, J. Immunol. 160: 5028-5036), antisueros de control de ratón y cobaya, antisueros anti-NspA recombinante de ratón y antígeno CHORI, y antisueros de la vacuna anti-Noruega de cobaya.

La Figura 7 resume los resultados de mediciones de la actividad bactericida mediada por complemento de los antisueros anti-antígeno CHORI de cada una de las cepas meningocócicas B ensayadas. Las 12 cepas se destruyeron por el complemento junto con concentraciones similares de un control positivo Acm anti-capsular (SEAM 12; IgG2a subtipo (Granoff *et al.*, 1998, J. Immunol. 160: 5028-5036). De manera similar, las 11 cepas que fueron positivas para la unión a antisueros anti-CHORI mediante el ensayo de flujo eran susceptibles a bacteriolisis mediada por complemento inducida por anticuerpos (a una dilución de 1:10 o mayor, cada una mostrando una destrucción mayor del 50 %, en comparación con las UFC/ml presentes en el tiempo 0). Además, las cepas meningocócicas A y C heterólogas que fueron positivas cuando se ensayaron en el ensayo de flujo también fueron positivas en el ensayo bactericida (Figura 5). De nuevo, únicamente la cepa M136, que no expresa PorA, y que fue negativa para la unión a anticuerpos en el ensayo de flujo, fue resistente a la destrucción en el ensayo bactericida. Por otro lado, los anticuerpos provocados bien por la vacuna Noruega o por rNSpA, ambas de las cuales son candidatos de vacuna meningocócica B actualmente ensayadas en seres humanos, pudieron activar la bacteriolisis mediada por complemento solo con un número limitado de un conjunto de cepas genéticamente diferentes. Al igual que con el ensayo de flujo, los antisueros de la vacuna anti-NspA y los antisueros de la vacuna anti-Noruega eran bactericidas solo contra un número limitado de las cepas.

La Figura 8 resume los resultados del ensayo de la actividad bactericida mediada por complemento de los antisueros anti-CHORI preparados en un segundo experimento en ratones. Los datos se muestran para antisueros preparados con la vacuna CHORI administrada con CFA o fosfato de aluminio (sin CpG). Los resultados se muestran para las 14 cepas meningocócicas B ensayadas en este experimento (8 con serosubtipos heterólogos a los de las cepas de vacuna). Los resultados también se muestran para una cepa adicional MenB en la que el gen que codifica NspA se ha inactivado (BZ198ΔNspA). Los antisueros anti-CHORI destruyeron las 15 cepas (14/15 con vacuna CHORI administrada con CFA; y 13/15 con vacuna CHORI administrada con fosfato de aluminio; para las cepas heterólogas, 6/7 y 5/7, respectivamente). En cambio, los antisueros de animales de control a los que se había administrado 3 inyecciones de MV de *E. coli* destruyeron solo 1 de 15 cepas. Estos resultados de un segundo experimento realizado en ratones confirman los resultados anteriores obtenidos con la vacuna CHORI en el experimento 1. Además, los datos indican que el segundo adyuvante, oligonucleótidos CpG, no utilizado en el segundo experimento, no es necesario para que la vacuna CHORI suscite anticuerpos ampliamente reactivos.

Un grupo de ratones en el segundo experimento recibió tres inyecciones, cada una de ellas constituida por una mezcla de las mismas MV, MV y VME usada en la inmunización secuencial. Los antisueros resultantes fueron bactericidas contra 12 de las 15 cepas (4 de 7 de las cepas heterólogas). La inmunización con la mezcla de antígenos suscitó una actividad bactericida más amplia que la esperada pero los títulos medidos contra las mismas cepas tenderían a ser mucho más bajos que los obtenidos en animales que recibieron la inmunización secuencial con la vacuna CHORI (por ejemplo, cepas CU385 y 1000, titulaciones de 1:128 y 1:128 después de la vacuna CHORI/fosfato de aluminio frente a títulos de <1:4 y 1:6 en antisueros preparados contra tres inyecciones de antígenos mixtos/fosfato de aluminio).

En un tercer experimento, se inmunizaron grupos de cobayas con la vacuna CHORI administrada con fosfato de aluminio (sin CpG), o hidróxido de aluminio (sin CpG). Los resultados se muestran en la Figura 9 para 9 cepas meningocócicas B ensayadas (5 con serosubtipos heterólogos con respecto a los de las cepas de la vacuna) y para una cepa MenB adicional en la que el gen que codifica la NspA se había inactivado (BZ198ΔNspA). Los antisueros anti-CHORI destruyeron 9 de las 10 cepas frente a 0 de las 10 cepas destruidas por los antisueros de animales de control que recibieron 3 inyecciones de MV de *E. coli*. Por tanto, la vacuna CHORI provoca respuestas bactericidas de anticuerpos ampliamente basadas en cobayas, un segundo modelo animal que puede ser más predictivo de respuestas protectoras de anticuerpos en seres humanos en comparación con ratones.

F. Protección pasiva en animales

Una crítica de las pruebas bactericidas es que ensaya la actividad de anticuerpos contra bacterias cultivadas en caldo, y que las bacterias cultivadas *in vivo* pueden tener diferentes propiedades. Por lo tanto, la capacidad del antisuero anti-CHORI de ratón para conferir protección pasiva contra la bacteriemia de *N. meningitidis* de grupo B se ensayó en crías de rata expuestas por IP, utilizando un modelo aceptado en la técnica y un método adaptado de Saukkonen *et al.* (J. Infect. Dis., 1988, 158: 209-212), que se considera en el campo como predictivo de resultados en seres humanos. Para este estudio se seleccionó la cepa meningocócica B 8047, que fue positiva por el ensayo de citometría de flujo para epítomos accesibles en la superficie del antígeno CHORI y susceptibles a actividad bactericida del antígeno anti-CHORI. Crías lactantes (de 6 a 7 días de vida) de seis camadas de ratas Wistar no consanguíneas (Charles River, Hollister, CA) se redistribuyeron aleatoriamente a las madres lactantes. Grupos de cinco a seis animales se expusieron por vía IP a 100 ml de aproximadamente 5×10^3 UFC de la cepa del grupo B 8047. La cepa utilizada se había sometido a tres pases en crías de rata. Las bacterias aisladas de cultivos de sangre después del tercer pase se cultivaron en agar chocolate durante una noche y se conservaron congeladas a -70 °C en viales que contenían leche descremada estéril. El día del experimento, las bacterias se cultivaron, se lavaron y se resuspendieron en tampón PBS que contenía BSA al 1 %, como se describe anteriormente para el ensayo bactericida.

Los animales recibieron antisueros o anticuerpos diluidos en PBS que contenía BSA al 1 % por inyección IP 2 horas antes de la exposición a las bacterias. Dieciocho horas después de la exposición a las bacterias, se obtuvieron muestras de sangre por punción en el corazón con una jeringa y una aguja que contenía una o dos gotas de 25 unidades/ml de heparina sin conservante (Fujisawa USA, Deerfield, IL). Se sembraron en placas alícuotas de 1, 10 y 100 microlitros de sangre en agar chocolate. Después de una incubación durante una noche de las placas a 37 °C, con CO₂ al 5 % se determinaron las UFC por ml de sangre.

La Figura 10 resume los resultados de los cultivos bacterianos cuantitativos realizados en muestras de sangre obtenidas 18 horas después de la exposición. Una dosis de 10 microgramos por rata del anticuerpo anticapsular control positivo, SEAM 3, fue completamente protectora contra la cepa como lo fueron los antisueros anti-CHORI de ratón a una dilución de 1:20. En cambio, los antisueros de la vacuna anti-Noruega de cobaya (1:20) y los dos sueros de control (antisueros de ratón preparados contra proteínas de *E. coli* o antisueros de cobaya de animales inmunizados solo con alumbre) no pudieron proteger contra la bacteriemia causada por la cepa 8047.

En un segundo experimento de protección pasiva usando el protocolo descrito anteriormente, los antisueros de la vacuna anti-CHORI preparados en cobayas también mostraron que protegían a ratas de cría de la bacteriemia meningocócica B después de exposición IP (Figura 11). La protección se observó en animales tratados con antisueros preparados para administrar la vacuna con fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fue superior a la protección observada en los animales de control tratados con 20 µg de un anticuerpo monoclonal anticapsular murino (SEAM 3).

G. Inmunoprecipitación de antígenos de superficie reconocidos por anticuerpos antigénicos anti-CHORI

El método usado para la inmunoprecipitación de antígenos accesibles a la superficie se basó en el descrito por Hansen *et al.* (1981 Infect. Immun. 33: 950-953) y Gulig *et al.* (1982 Infect. Immun. 37: 82-88). En los estudios de la presente invención, el método se usó bien con células no marcadas, o con células en las que las proteínas de superficie se habían tratado con radioyodo. Las células se cultivaron en caldo de Mueller-Hinton (~7 ml) a una DO de 0,6 y se recogieron por centrifugación a 5000 x g a 4 °C. El sedimento celular se lavó dos veces en PBS frío que contenía BSA al 1 % o, para el ensayo de radioinmunoprecipitación, solo en PBS.

Las células a tratar con yodo se transfirieron a un tubo de vidrio. Se añadió un nanomol de KI y 1 mCi de Na¹²⁵I (Amersham) a la suspensión celular. El tratamiento con radioyodo comenzó con la adición de H₂O₂ al 0,03 % (50 µl) y lactoperoxidasa (Sigma, St. Louis, MO) en agua (50 µl de 1 solución de 1 mg/ml). Se añadieron las mismas cantidades de H₂O₂ y lactoperoxidasa a intervalos de 4 minutos durante 12 minutos. La reacción finalizó después de 16 minutos añadiendo la mezcla de reacción a PBI frío (20 ml) (es decir NaI sustituido por NaCl en PBS). Las células se recogieron por centrifugación (5.000 x g, 10 min, 4 °C), se lavaron 2 veces con PBS, y después se usaron inmediatamente.

Las células se resuspendieron en PBS (2 ml) que contenía BSA al 1 %. Se añadieron los antisueros a alícuotas de 0,5 ml de suspensión celular. La mezcla se incubó con balanceo durante 90 minutos a 4 °C. Después, las células se recogieron por centrifugación (centrifugación durante 1 minuto en una microcentrífuga), se lavaron dos veces con PBS/BSA al 1 % y se resuspendieron en 1 ml de tampón de solubilización (tampón Tris 50 mM, pH 7,8, que contenía NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1 %, desoxicolato sódico al 0,2 % y dodecil sulfato sódico al 0,1 %). Después de incubar durante 60 minutos a 37 °C, el material insoluble se retiró por centrifugación (45.000 x g durante 60 minutos a 20 °C). Los sobrenadantes se transfirieron después a tubos que contenían 3-4 miligramos de perlas de proteína A Sepharose (Sigma) previamente equilibrados con 50 µl de PBS. Las muestras se incubaron durante una noche a 4 °C con balanceo. Las perlas se lavaron cinco veces con tampón de solubilización. Las proteínas unidas se liberaron de las perlas añadiendo 75 µl de tampón de muestra SDS y se calentó a 100 °C durante 1 minuto. Después de retirar el sobrenadante, se añadió 1 µl de 2-mercaptoetanol a cada muestra y después se calentó de nuevo a 100 °C durante 1 minuto. Después, las muestras se procesaron en un gel de SDS-PAGE al 15 % y se tiñeron usando tinción de plata (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

Para las transferencias de Western, el gel se equilibró con tampón (Tris•HCl 48 mM, glicina 39 mM, pH 9,0, metanol al 20 % (v/v)) y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) usando una célula de transferencia electroforética semiseca Trans-Blot™ (Bio-Rad). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche descremada al 2 % (p/v) en PBS que contenía azida sódica al 0,2 % (p/v). Los antisueros se diluyeron en el mismo tampón de bloqueo que contenía Tween 20 al 0,1 %. El anticuerpo unido se detectó usando anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG, A, M de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed, South San Francisco, CA) diluido en PBS que contenía BSA al 1 % (p/v), Tween-20 al 1 % (p/v) y azida sódica al 0,2 % (p/v) y sustrato BCIP/NBT de Sigma Fast™ (Sigma).

La Figura 12 es un gel SDS teñido con plata que demuestra proteínas de superficie celular precipitadas con los antisueros anti-CHORI (Carril 2) de M7, un mutante no encapsulado de la cepa NMB, del serogrupo B (Stephens *et al.* 1991, Infect. Immun. 59; 4097-4107). Seis proteínas que tenían masas aparentes de 59,5, 40,7, 39,6, 33, 27,9 y 14,5 kDa se precipitaron por los antisueros preparados contra el antígeno CHORI (Carril 2) pero no por los

antisueros anti-proteína *E. coli* de control (Carril 3). Se obtuvieron los mismos resultados cuando se usaron los anti sueros antigénicos anti-CHORI para precipitar las proteínas de superficie de la cepa parental encapsulada, NMB (datos no mostrados). Excepto para las proteínas de Ig de cadena pesada y ligera de 59,5 y 27,9 kDa (véase más adelante), se observaron las mismas proteínas de superficie detectadas por tinción de plata también en células marcadas con ¹²⁵I (datos no mostrados).

Cabe destacar que no había lipooligosacárido (LOS), que pudiese detectarse por tinción con plata, que precipitase por los antisueros antigénicos anti-CHORI. Se diseñaron otros experimentos, descritos a continuación, para determinar si la unión de la superficie observada y la actividad biológica protectora de los antisueros anti-vacuna CHORI se debían a anticuerpos anti-LOS.

La Figura 13 muestra una transferencia de Western de las mismas muestras resueltas en gel SDS en la Figura 12. Las muestras de los carriles 1 a 3 se detectaron por antisueros anti-vacuna CHORI. Las muestras de los carriles 4 a 6 se detectaron por un Acm específico anti-PorA P1.2. Las proteínas que tenían masas aparentes de 59,5 y 27,9 kDa en la Figura 13, (Carriles 2, 3, 5 y 6) corresponden a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, respectivamente, detectadas con el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. La proteína de 40,7 kDa precipitada por los antisueros antigénicos anti-CHORI (Figura 12, Carril 2), fue reactiva con el anticuerpo específico anti-PorA P1.2 en la transferencia de Western (Figura 13, Carril 5), y es, por lo tanto, PorA P1.2. Como se esperaba, también se detectó PorA P1.2 en la proteína total de M7 (Figura 13, Carril 4). Los antisueros anti-vacuna CHORI detectaron solo la proteína de 33 kDa (Carril 2) y no PorA. Por lo tanto, los antisueros preparados contra el antígeno CHORI reaccionan con la proteína de 33 kDa tanto nativa como desnaturalizada pero solo formas nativas de las proteínas de 40,7, 39,6 y 14,5 kDa están presentes en la superficie celular de la cepa M7 (Figura 12, carril 2).

Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación similares en las preparaciones MV y VME usadas para la inmunización y siete cepas del serogrupo B encapsuladas, genéticamente diferentes. Los resultados se resumen en la Figura 14. Cuando se comparan los resultados, es obvio que la inmunización secuencial con vesículas de membrana de tres cepas meningocócicas genéticamente diferentes provoca anticuerpos que reconocen diversos antígenos. Algunos de los antígenos reconocidos son los mismos en todas las cepas; otros son específicos de cepa o comunes para subconjuntos de cepas. Por ejemplo, las proteínas que tenían masas aparentes de 37-41 kDa precipitaron de las cepas BZ 198 y NMB pero no de ninguna de las otras cepas. De manera similar, las proteínas que tenían una masa aparente de 25,7 kDa precipitaron de las cepas NG3/88 y S3446 pero de ninguna de las otras cepas. Sin embargo, hubo una proteína de superficie que tenía una masa aparente de 32 a 33 kDa que reconoció los antisueros antigénicos anti-CHORI en todos los ejemplos excepto para la cepa M136, que era negativa tanto en los ensayos de flujo como bactericidas. La proteína de 32 a 33 kDa puede ser un antígeno conservado.

Se realizaron experimentos adicionales en cepas de serogrupo B encapsuladas, CU385, BZ198 y 1000, usando células en las que las proteínas de superficie se habían tratado con radioyodo (Fig. 14A) y precipitado con antisueros inmunes de diferentes grupos de ratones a los que se había administrado la vacuna CHORI. Además de las proteínas descritas anteriormente, en este segundo conjunto de experimentos, precipitaron proteínas con masas moleculares aparentes entre 10 y 14,5 kDa y 80 kDa de las cepas CU385 y BZ198. Tres proteínas con masas moleculares aparentes de 26, 41 y 45 kDa precipitaron de la cepa 1000.

Es importante observar que no todos los antígenos reconocidos por los antisueros de ratones inmunizados con el antígeno CHORI inmunoprecipitaron de las células bacterianas. También había anticuerpos en los antisueros contra algunos antígenos (por ejemplo, la proteína NspA) que se observó que estaban presentes mediante un ELISA o transferencia de Western, pero que no inmunoprecipitaron en este experimento. El fallo de no detectar estos otros antígenos puede resultar del hecho de que el complejo anticuerpo/antígeno a detectar debe ser estable en presencia de detergentes (Triton X-100, desoxicolato y lauril sulfato).

H. Detección de proteínas reactivas en preparaciones de MV y VME de la vacuna CHORI con anticuerpos anti-vacuna CHORI provocados en ratones y cobayas.

La Figura 15 muestra una transferencia de Western de las MV de las cepas RM1090 (C:2a:P1.5,2:L3,7) y BZ198 (B:NT:P1.4) y VME de la cepa Z1092 (A:4:P1.10). Como anticuerpo de detección primario se usaron antisueros de ratones inmunizados con vacuna CHORI combinado con CFA, o a los que se administró adyuvante de fosfato de aluminio, o de cobayas inmunizadas con vacuna CHORI, junto con adyuvante de fosfato de aluminio. La transferencia muestra que la vacuna CHORI provoca anticuerpos que son reactivos con diversas proteínas que tienen similar masa molecular aparente en cada una de las preparaciones de MV o VME independientemente de la especie animal o del adyuvante usado en la vacuna. En la Figura 16 se resumen las masas moleculares aparentes de todas las proteínas en las preparaciones de MV o VME que son reactivas con los anticuerpos producidos por inmunización con vacuna CHORI.

L. Detección de la actividad de anticuerpos anti-LOS

Uno de los determinantes antigénicos sobre la superficie de los **meningococos** que se había observado que provocaba anticuerpos bactericidas es el lipooligosacárido (LOS). Para determinar si la vacuna CHORI provocaba anticuerpos anti-LOS, se preparó una columna de afinidad LOS y se usó para absorber anticuerpos anti-LOS en los antisueros anti-vacuna CHORI usando los métodos descritos por Shenep *et al.* (1982, J. Infect. Dis 145: 181-190) con las siguientes modificaciones. Se preparó LOS a partir de cada cepa de vacuna mediante el método de Appicella *et al.* (Bacterial Pathogenesis (1997) V. L. Clark y P. M. Bavoil eds. Academic Press, San Diego, CA), y se conjugó con BSA de la siguiente manera. El LOS (1 mg) se combinó con BSA (2 mg) en tampón MES 100 mM, pH 5,0. Se añadió EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl; 100 µl de una solución de 10 mg/ml en agua) con agitación seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Una misma mezcla de los tres conjugados LOS-BSA (conjugado LOS-BSA 1 mg por ml de gel hidratado) se acopló a perlas de agarosa activadas con CNBr (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en tampón de carbonato sódico (0,1 M, pH 8,0) durante una noche a temperatura ambiente.

Después de retirar los anticuerpos anti-LOS, haciendo pasar la vacuna anti-CHORI y los antisueros antigénicos mezclados anti-CHORI a través de la columna de afinidad LOS, los antisueros se concentraron a su volumen original por ultrafiltración y se ensayó presencia de anticuerpos anti-LOS por ELISA y la actividad bactericida mediada por complemento contra dos cepas MenB (BZ198 y S3032). Como se resume en la Figura 17, la presencia de anticuerpo anti-LOS se redujo enormemente o se eliminó por absorción con la columna de afinidad conjugada con LOS-BSA. Como se muestra en la Figura 18, no hubo ninguna o escasa diferencia en los títulos bactericidas entre los sueros absorbidos y no absorbidos de ratones o cobayas inmunizados con la vacuna CHORI, lo que indica que el anticuerpo anti-LOS no contribuye significativamente a la actividad bactericida contra cualquiera de una cepa de vacuna (BZ198) o cepa S3032, que tiene PorA y PorB que son heterólogas a las cepas usadas para preparar la vacuna. Esto tuvo un gran efecto sobre los títulos bactericidas de los antisueros preparados de ratones y cobayas inmunizados con la vacuna Mixta CHORI indicando una contribución más significativa de los anticuerpos anti-LOS contra el título bactericida en estos antisueros.

J. Preparación de anticuerpos monoclonales.

Ratones hembra CD1 (Charles River, Hollister, California) se vacunaron secuencialmente con MV preparadas a partir de la cepa meningocócica RM1090 (C:2a:P1.5,2), BZ198 (B:NT:7,4) y VME de la cepa Z1092 (A:4,21:P1.10). Los ratones recibieron tres inyecciones de 100 microlitros, cada una de ellas separada con un intervalo de tiempo de tres semanas, que contenían 5 microgramos de proteína. Las dos primeras dosis se administraron por vía subcutánea junto con fosfato de aluminio (0,5 % en peso/volumen) y la dosis final se proporcionó sin adyuvante y se administró por vía intraperitoneal (i.p.). Tres días más tarde, los animales se sacrificaron y los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma (P3X63-AG8.653) a una proporción de 1 esplenocito con respecto a 1,7 células de mieloma. Después de dos semanas de incubación en medio HAT selectivo, se exploraron sobrenadantes de hibridoma para detectar la actividad de unión de anticuerpos por ELISA de células enteras utilizando, como antígeno diana, las cepas MenB, encapsuladas, 1000 y CU385. Se usó el método descrito por Abdillahi y Poolman, (Microb Pathog. 1988 4: 27-32) para el ensayo de ELISA de células enteras. Los hibridomas que secretaban anticuerpos que eran reactivos tanto con la cepa 1000 como con la cepa CU385 en un ELISA de células enteras y que eran positivos para la unión por citometría de flujo se clonaron por dilución limitante y después se expandieron y se congelaron para su uso posterior en cultivo de tejidos.

Anticuerpos de ocho líneas celulares se caracterizaron con detalle. Las subclases de los anticuerpos monoclonales se determinaron usando un ELISA con anticuerpo de captura y anticuerpo policlonal conjugado con fosfatasa alcalina específico para cada una de las subclases de IgG de ratón, IgM, IgA, y cadenas ligeras κ y λ (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Ala.). Los anticuerpos monoclonales producidos por los clones de hibridomas se recogieron de los medios de cultivo tisulares por precipitación con sulfato de amonio (55% p/v). La concentración del Acm purificado se determinó por ELISA de captura usando Ig convencionales, según recomendaciones del fabricante (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Ala.).

K. Reactividad de los Acm antigénicos anti-CHORI con diversas cepas MenB.

La capacidad de los Acm preparados de ratones inmunizados con el antígeno anti-CHORI (administrado con CFA o con fosfato de aluminio) para unirse a diversas cepas MenB se determinó por ELISA de células enteras (Abdillahi y Poolman, Microb Pathog. 1988 4: 27-32). Los resultados se resumen en la Figura 19. Ninguno de los anticuerpos monoclonales reaccionó con LOS preparado a partir de las cepas inmunizantes. Los Acm 1D9 y 14C7 eran reactivos con los antígenos en todas o casi en todas las cepas meningocócicas ensayadas pero no con cualquier cepa de *Neisserial*. El Acm 14C7 es específico para la proteína de superficie *Neisserial* muy conservada, NspA ya que es reactivo con rNspA expresada en *E. coli*. Este Acm también es reactivo con las cepas 8047 y BZ198 pero no reactivo con las cepas correspondientes en las que el gen de NspA se ha inactivado. A diferencia de los anticuerpos ampliamente reactivos, los antígenos reconocidos por los Acm 4B11 y 9B6 se limitan a determinadas cepas. Hay que tener en cuenta que el Acm 4bis11 es reactivo con la cepa 8047 pero no con el mutante 8047 correspondiente en el que se había inactivado el gen de NspA. Sin embargo, el Acm 4B11 no se une a rNspA expresada en vesículas

E. coli ni tampoco se une a la cepa BZ198, que se sabe que se sobreexpresa de forma natural (véase Moe *et al.* (1999 Infect. Immun. 67: 5664; Moe *et al.* Infect Immun. 200169: 3762). Por lo tanto, el Acm 4B11 puede reconocer un epítipo de NspA que es específico para la cepa 8047, o un epítipo en otra proteína de membrana que no está presente en la cepa BZ 198 pero que está presente y está asociada con la expresión de NspA en la cepa 8047. Considerando en su conjunto los resultados con los diferentes Acm se muestra que la vacuna antigénica anti-CHORI provoca anticuerpos contra proteínas tanto altamente conservadas como no conservadas.

L. Actividad bactericida de Acm antigénicos anti-CHORI con diversas cepas MenB.

En la Figura 20 se resume la actividad bactericida mediada por complemento de los Acm preparados a partir de ratones inmunizados con el antígeno anti-CHORI y ensayado contra varias cepas MenB. El anticuerpo monoclonal 1D9 (ATCC PTA-3552), que reacciona por ELISA con todas las cepas de *N. meningitidis* ensayadas, no fue bactericida. El anticuerpo monoclonal 14C7 (ATCC PTA-3554), que parecía reconocer NspA, fue bactericida o bacteriostático contra todas las cepas ensayadas excepto para BZ198ΔNspA (una genosupresión de NspA). La actividad del anticuerpo monoclonal 14C7 fue superior a la del anticuerpo monoclonal control AL12 (producido en ratones inmunizados con NspA recombinante (véase Moe *et al.* Infect Immun. 2001 69: 3762). Esta observación sugiere que la inmunización con la vacuna CHORI proporciona un medio superior para provocar anticuerpos bactericidas anti-NspA en comparación con la inmunización con una vacuna basada en NspA recombinante.

El anticuerpo monoclonal 4B11 (ATCC PTA-3553) (un anticuerpo de IgM) fue bactericida contra las cepas 1000 y CU385. Cabe destacar que el anticuerpo monoclonal 4B11 no reaccionó con estas mismas cepas por ELISA de células enteras a la concentración más alta ensayada (véase la Figura 19). Los ensayos bactericidas miden la actividad funcional de los anticuerpos usando bacterias vivas mientras que el ELISA con células bacterianas mide la unión de los anticuerpos a bacterias destruidas por calor, que en estas cepas pueden haber desnaturalizado la diana antigénica del Acm 4B11.

Depósitos

Se realizó un depósito de cultivos biológicamente puros de los materiales indicados en la siguiente tabla en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest, en o antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. El número de acceso indicado se asignó después del ensayo de viabilidad satisfactorio y de abonar los pagos exigidos. Toda la restricción sobre la disponibilidad de dichos cultivos para el público se eliminó irrevocablemente tras la concesión de una patente basada en la solicitud. Por otra parte, los depósitos designados se mantendrán durante un periodo de treinta (30) años a partir de la fecha del depósito, o durante cinco (5) años después de la última solicitud del depósito; o durante la vida ejecutable de la patente de Estados Unidos, en el que sea más larga. En el caso de un cultivo convertido en inviable o que se ha destruido de forma inadvertida, o en el caso de cepas que contienen plásmido, pierden su plásmido, será reemplazado con un cultivo (o cultivos) viable (o viables) de la misma descripción taxonómica.

Estos depósitos se proporcionan simplemente como conveniencia para los expertos en la técnica y no son una aceptación de que se requiera un depósito. Puede requerirse un permiso para preparar, usar o comercializar los materiales depositados y dicho permiso no se otorga a través de la presente memoria. El depósito indicado más adelante se recibió en la ATCC en o antes de la fecha de presentación de la presente solicitud.

Descripción	Nº de Acceso en la ATCC
Hibridoma 1D9	PTA-3552
Hibridoma 4B 11	PTA-3553
Hibridoma 9B8	PTA-3551
Hibridoma 14C7	PTA-3554
Cepa MenC RM 1090	PTA-3557
Cepa MenB BZ198	PTA-3555
Cepa MenA Z1092	PTA-3556

Listado de secuencias

<110> Granoff, Dan Moe, Gregory R.

<120> VACUNAS PARA LA PROTECCIÓN DE AMPLIO ESPECTRO CONTRA ENFERMEDADES CAUSAS POR NEISSERIA MENINGITIDIS

ES 2 519 440 T3

<130> CHOR-001WO

<140> Sin asignar

<141> 27-07-2001

5

<150> US 60/221.495

<151> 27-07-2000

<160> 1

10

<170> FastSEQ para Versión Windows 4.0

<210> 1

<211> 20

15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos CpG

20

<400> 1

tccatgacgt tcctgacgtt 20

REIVINDICACIONES

1. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso en un método de tratamiento de un mamífero, en donde dicho tratamiento provoca una inmunidad de amplio espectro contra una enfermedad causada por una cepa de *Neisseria meningitidis*, en donde dicha primera preparación comprende vesículas de membrana externa (VME), microvesículas (MV) o tanto VME como MV de una primera cepa de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un primer serogrupo, un primer serotipo y un primer serosubtipo, en donde dicha segunda preparación comprende las VME, las MV o tanto las VME como las MV de una segunda cepa de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un segundo serogrupo, un segundo serotipo y un segundo serosubtipo, en donde dicha tercera preparación comprende las VME, las MV o tanto las VME como las MV de una tercera cepa de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un tercer serogrupo, un tercer serotipo y un tercer serosubtipo, y en donde el serogrupo, el serotipo y el serosubtipo de la primera, la segunda y la tercera cepa de *Neisseria meningitidis* son diferentes, y en donde la primera, la segunda y la tercera preparación se usan en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra epítopes presentes en dichas preparaciones; comprendiendo el método la administración en serie de la primera, la segunda y la tercera preparación, de tal manera que la segunda preparación se administra después de que dicho mamífero se haya sensibilizado inmunológicamente por exposición a la primera preparación y la tercera preparación se administra después de que dicho mamífero se haya sensibilizado inmunológicamente por exposición a la segunda preparación, en donde la administración de la primera, la segunda y la tercera preparación es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria en dicho mamífero, confiriendo dicha respuesta inmunitaria inmunoprotección contra una enfermedad causada por al menos una cepa de *Neisseria meningitidis*, y en donde dichas primera, segunda y tercera preparaciones son eficaces para provocar una respuesta de anticuerpos bactericida contra al menos una cepa de *Neisseria meningitidis* que expresa un epítipo del serosubtipo no incluido en la primera, la segunda o la tercera preparación.
2. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la primera preparación comprende las MV y la segunda preparación comprende las MV.
3. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que la tercera preparación comprende las MV.
4. Una primera, una segunda y tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que la tercera preparación comprende las VME.
5. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera preparación comprende las VME y la segunda preparación comprende las VME.
6. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera preparación comprende las MV y la segunda preparación comprende las VME.
7. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera preparación comprende las VME y la segunda preparación comprende las MV.
8. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la inmunoprotección conferida es contra al menos cuatro cepas de *Neisseria meningitidis*.
9. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 en donde la inmunoprotección conferida es contra más de una cepa de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B.
10. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la inmunoprotección conferida es contra un miembro de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B.
11. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde las preparaciones de VME y/o de MV se administran junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.
12. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 en donde los excipientes comprenden un adyuvante.
13. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 en donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre y MF59.
14. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la administración se realiza por inyección, por aerosol o por vía oral.

ES 2 519 440 T3

15. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el mamífero es un ser humano.
- 5 16. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 en donde el ser humano es inmunológicamente intacto con respecto a *Neisseria meningitidis*.
17. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 16 en donde el ser humano es un niño menor de cinco años.
- 10 18. Una primera, una segunda y una tercera preparación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en donde dichas preparaciones se prepararan por extracción con detergente utilizando un detergente distinto de desoxicolato.

Figura 1. Resumen de ensayos de eficacia de vacunas con vesículas de membrana externa meningocócicas*

Años del estudio	Vacuna Cepa	Localidad (población vacunada)	Edad (años)	Eficacia estimada (%)
1987-89	B:4:P1.15 C PS /alumbre	Cuba (100.000 escolares)	de 11 a 16	83
1989-90	B:4:P1.15 C PSb/alumbre	Sao Paolo, Brasil (300.000 niños)	de 2 a 4 de 4,1 a 7	47 74
1990-91	B:4:P1.15 C PS/alumbre	Río de Janeiro, Brasil (2,4 millones de niños)	de 3/12 a 7 de 4 a 7	58 71
1988-90	B:4:P1.3 C PS/alumbre	Iquique, Chile (40.000 niños)	de 1 a 3,9 de 4 a 21	-23 70
1989-91	B:15:P1.7,16 alumbre	Noruega (171.800 escolares)	de 14 a 16	57

*Adaptado de Frasch (1995, en MENINGOCOCCAL DISEASE, K. Cartwright (ed.), Wiley, Nueva York, NY, pág. 266). En Noruega, se administraron dos dosis de vacuna con un intervalo de diferencia de 6 semanas. La eficacia fue del 87 % en el primer año y después disminuyó durante los 18 meses de seguimiento posteriores, de manera que la eficacia global fue del 57 %. C PS = vacuna de polisacárido serogrupo C que se mezcló con las vesículas. Las preparaciones de alumbre eran Al(OH)₃

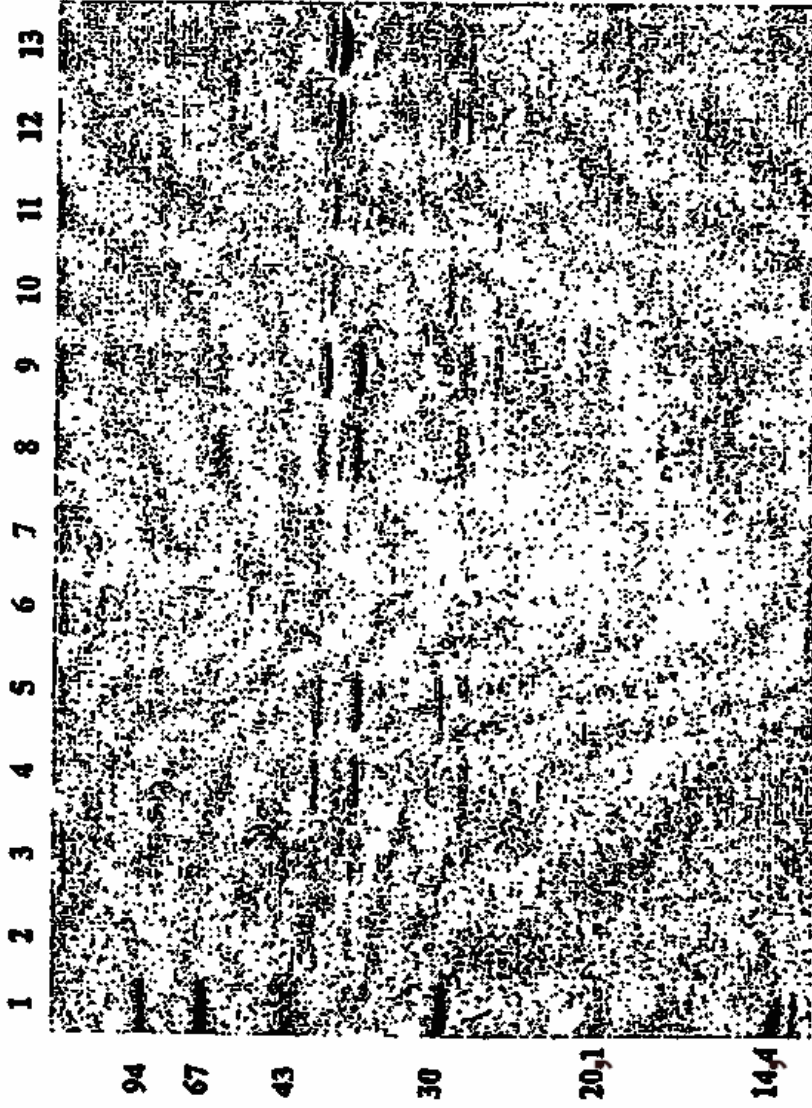


FIG. 2

FIG. 3.

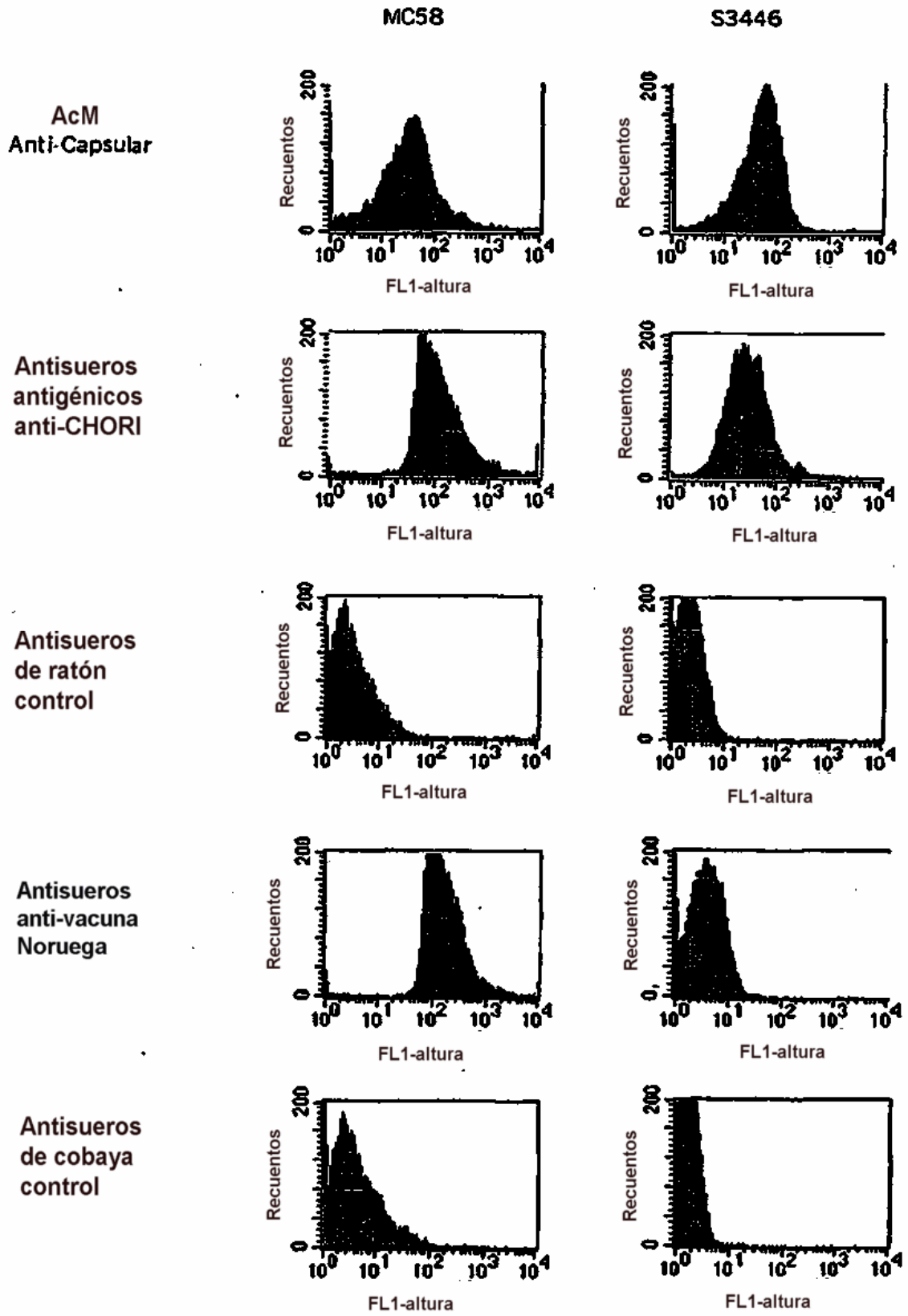


FIG. 4. Unión de antisueros a la superficie celular bacteriana determinada por citometría de flujo con fluorescencia indirecta

Cépa (serosubtipo)	PorA heterólogo contra cepas ⁺⁺⁺ de la vacuna CHORI	Reactividad de superficie por citometría de flujo con fluorescencia indirecta (1/título)+		
		Anti-CHORI ⁺⁺	Anti-Noruega ⁺⁺	Anti-NspA ⁺⁺
1000 (5)	-	>200	>200	20
2996 (5,2)	-	2000	<20	20
8047 (5,2)	-	>200	<20	>20
BZ198 (4)	-	2000	200	>20
CU385 (19,15)	+	>200	<20	>20
IH5341 (7,16)	+	>200	>200	<20
M136 (P-)	+	<20	<20	<20
M986 (5,2)	-	2000	<20	<20
MC58 (7,16)	+	200	>200	<20
NG3/88 (1)	+	200	200	<20
NMB (.5,2)	-	2000	NR	>20
S3446 (23,14)	+	200	<20	<20

+ El título se define como la dilución necesaria para proporcionar el 50 % de fluorescencia (FL1-altura) de 10 o más fluorescencia de células sobre el fondo en presencia de sueros de control.

++ Antisueros anti-CHORI preparados en ratones por inmunización secuencial con MV de la cepa RM1090 (C:2a;P1.5,2), después con MV de la cepa BZ198 (B:NT:P1.4) seguido de VME de la cepa Z1092 (A:4,21;P1.10) (véase el texto). Anti-Noruega se refiere a antisuero de cobayas a las que se administraron dos inyecciones de vacuna de VME preparada a partir de las cepa H44/76 (B:15:P1.7,16) por el National Institute of Public Health ("MenB-Folkehelse"), Oslo, Noruega. Anti-NspA se refiere a antisueros preparados en ratones CDI a los que se administraron tres inyecciones de NspA recombinante como describen Moe et al. (1999 Infect. Immun. 67: 5664).

+++ Serosubtipo (PorA) se diferencia del de las tres cepas usadas para preparar la vacuna. (Véanse las FIGS. 21 y 22).

Figura 5. Reactividad de antisueros CHORI contra cepas del serogrupo A y C de *N. meningitidis*

Cepa (serogrupo:serosubtipo)	Actividad bactericida (1/título)*		Unión en superficie por citometría de flujo con fluorescencia indirecta (1/titulación) ⁺	
	Sueros de control negativo	Anti- CHORI	Sueros de control negativo	Anti- CHORI
60E (C:PI.7.1)	<10	>250	<20	~2000
Z1073 (A:PI.3,6)	<10	>250	NR	>>100

* La dilución de suero produce un 50 % de disminución en las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro después de 60 minutos de incubación de bacterias en presencia de complemento humano en comparación con las UFC/ml al tiempo cero de controles (véase la figura 6 más adelante).

+ Véanse notas al pie de página de la FIG. 4 y texto

Figura 6. Resultados de una prueba bactericida que ensaya antisueros antigénicos anti-CHORI, anti-rNspA y de vacuna anti-Noruega contra la cepa meningocócica B 2996

Complemento	Fuente animal de sueros o AcM	Anticuerpo/Antisuero ⁺	Concentración final /Dilución	UFC/20 μ l 0'	UFC/20 μ l 60'	% de Supervivencia
Ninguno	-	Ninguno	0	189	250	132
Ninguno	-	Ninguno	0	171	250	146
Activo	-	Ninguno	0	175	250	143
Inactivo	-	Ninguno	0	180	250	139
Activo	-	Complemento	1:5	190	250	132
Activo	Ratón	AcM anti-capsular	200 μ g/ml		1	1
Activo	Ratón	AcM anti-capsular	100 μ g/ml		43	24
Activo	Ratón	AcM anti-capsular	50 μ g/ml		225	124
Inactivo	Ratón	AcM anti-capsular	200 μ l/ml		230	127
Activo	Ratón	Anti-rNspA	1:10		250	138
Activo	Ratón	Anti-rNspA	1:50		250	138
Activo	Ratón	Anti-rNspA	1:250		250	138
Activo	Ratón	Antígeno anti-CHORI	1:10		0	0
Activo	Ratón	Antígeno anti-CHORI	1:50		2	1
Activo	Ratón	Antígeno anti-CHORI	1:250		55	30
Activo	Ratón	Control anti- <i>E. coli</i>	1:10		>250	138
Activo	Cobaya	Vacuna anti-Noruega	1:5		220	122
Activo	Cobaya	Vacuna anti-Noruega	1:25		245	135
Activo	Cobaya	Vacuna anti-Noruega	1:125		250	138
Activo	Cobaya	Control anti-alumbre	1:5		250	138

+ Véanse notas al pie de página de la FIG. 4 y texto.

Figura 7. Actividad bactericida mediada por complemento de antisueros y anticuerpos.

Cepa (serosubtipo)	PorA heteróloga contra cepas de la vacuna CHORI	Actividad bactericida (1/título) ⁺		
		Anti-CHORI	Anti-Noruega	Anti-NspA
1000 (5)	-	130	>125	<10
2996 (5,2)	-	>250	<5	<10
8047 (5,2)	-	>250	<5	<10
BZ198 (4)	-	>250	I ⁺⁺	110
CU385 (19,15)	+	>250	<25	<10
IH5341 (7,16)	+	>250	I ⁺⁺	<10
M136 (P-)	+	<10	<5	<10
M986 (5,2)	-	>250	<5	<10
MC58 (7,16)	+	>250	>125	<10
NG3/88 (1)	+	13	9	<10
NMB (5,2)	-	>100	<5	16
S3446 (23,14)	+	10	<5	<10

+ Véanse notas al pie de página de las FIGS. 4 y 5 y texto. Un título > se refiere a la dilución más alta ensayada; un título < se refiere a la dilución más baja ensayada.

I⁺⁺, indeterminado debido a la presencia de actividad bactericida en los antisueros de control negativo contra esta cepa.

Figura 8. Actividad bactericida mediada por complemento de antisueros de ratones inmunizados con las vacunas indicadas.

Cepa (serosubtipo)	Por A heteróloga contra cepas de la vacuna CHORI ⁺⁺⁺	Actividad bactericida (I/título) ⁺⁺⁺			
		CHORI CFA ⁺ (N = 7)	CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃ ⁺ (N = 7)	MEZCLA CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃ ⁺ (N = 10)	MV de <i>E. COLI</i> / Al ₂ (OPO ₄) ₃ (N = 10)
1000 (5)	-	20	128	6	<4
8047 (5,2)	-	125	300	125	<25
BZ198 (4)	-	650	220	1000	<4
BZ198 NspA(4)	-	317	131	235	<4
BZ83 (10)	-	275	109	205	<25
CU385 (19,15)++	+	>128	128	<4	<5
H44/76 (7,16)	+	>128	>128	21	6
M136 (P-)	+	100	<4	5	<4
M986 (5,2)	-	193	101	133	<4
MC58 (7,16)++	+	47	8	7	<4
NG3/88 (7,1)	+	<4	4	<4	<4
NGP165 (5,2)	-	82	120	90	<4
NMB (5,2)	-	183	441	141	<4
S3032 (12,16)	+	125	400	230	<25
S3446 (22,14)	+	18	<4	<4	<4

+CHORI/CFA, inmunización secuencial con una dosis de 5 µg de MV de la cepa RM1090 (C:2a;P1.5,2) con CFA, MV de la cepa BZ198 (B:NT:P1.4) con IFA y VME de la cepa Z1092 (A:4,21:P1.10) sin adyuvante; CHORI/Al₂(OPO₄)₃ lo mismo que CHORI/CFA excepto que se utiliza fosfato de aluminio como adyuvante; MEZCLA CHORI/Al₂(OPO₄)₃, igual que CHORI/Al₂(OPO₄)₃ excepto que cada dosis de 5 µg contiene una mezcla igual de las tres preparaciones de MV/VME; MV de *E. COLI* / Al₂(OPO₄)₃ preparada a partir de la cepa BL21(DE3) de *E. coli*.

++p/glu, crecimiento de cultivo celular en presencia de glucosa al 0,3 %. ⁺⁺⁺ Véanse notas al pie de página y texto de la FIG. 4.

FIG. 10 Protección pasiva en crías de rata contra bacteriemia de la cepa meningocócica B 8047 por antisueros y anticuerpos.+

Tratamiento ⁺⁺	Dosis/rata o dilución en suero (100 microlitros)	Cultivo sanguíneo obtenido a las 18 horas	
		Nº Positivo/nº total	Media geométrica, 10 ³ UFC/ml
AcM anti-capsular	10 microgramos	0/5	<1
Control PBS	-	5/5	>200
Control anti- <i>E. coli</i>	1:20	5/5	>200
Anti-CHORI	1:20	0/5	<1
Anti-Noruega	1:20	5/5	83
Control alumbre	1:20	5/5	178

+ Los animales se pretrataron en el tiempo 0 con anticuerpos de control o de ensayo y se expusieron 2 horas después con 5×10^3 unidades formadoras de colonias de la cepa 8047 de *N. meningitidis* en fase logarítmica administrada por vía IP.

++ Véanse notas al pie de página de la FIG. 4 y texto

FIG. 11. Protección pasiva en crías de rata contra bacteriemia de la cepa meningocócica B 8047 por antisueros de cobaya
Cultivo sanguíneo obtenido a las 18 horas

Tratamiento ⁺	Dosis/rata o dilución en suero (100 microlitros)	Nº Positivo/nº total	Media geométrica, 10 ³ UFC/ml
Pre-inmunización	1:10	6/6	21,9
Anti-CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃	1:10	0/6	<0,001
Anti-CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃	1:100	4/6	1,3
Anti-CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃	1:1000	6/6	193
Anti-CHORI/ Al ₂ (OH) ₃	1:10	0/6	<0,001
Anti-CHORI/ Al ₂ (OH) ₃	1:100	6/6	47,4
Anti-CHORI/ Al ₂ (OH) ₃	1:1000	6/6	32,0
MV anti- <i>E. coli</i>	1:10	6/6	110
AcM anti-capsular de ratón (SEAM 3)	20 µg	3/3	1,4

+ Véanse notas al pie de página de las FIGS. 9 y 10 y texto.

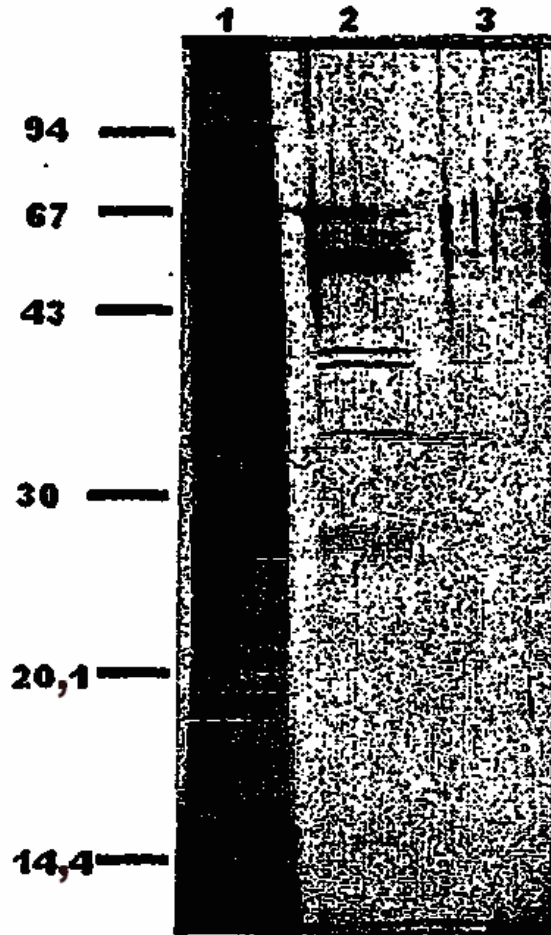


FIG. 12.

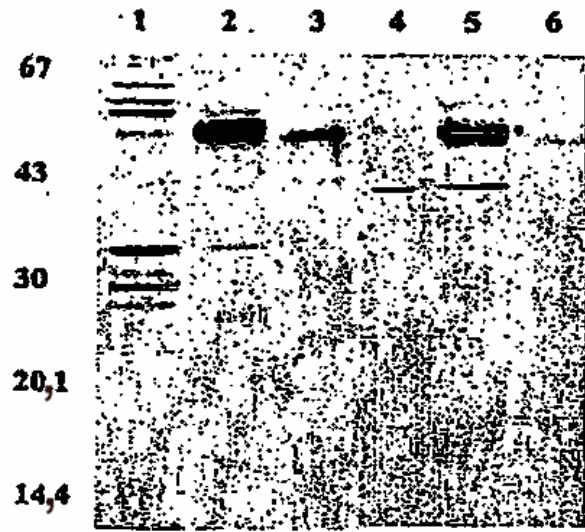


FIG. 13

FIG. 14. Proteínas accesibles en la superficie bacteriana precipitadas por antisueros agrupados de ratones inmunizados secuencialmente con MV MenC de la cepa RM1090, MV MenB de la cepa BZ198 y VME MenA de la cepa Z1092

Cepa/muestra	Serotipo:subtipo ⁺	Proteínas precipitadas (por masa aparente en kDa)		
		37-41	31-33	<30
MV RM1090	2a:P1.5,2:L3,7	40,7,39,6	32	
MV BZ198	NT:NST	37,1,35,1	32,30	
VME Z1092	4,2l:P1.10	40,7,39,1, 38,6,37,6	33,1,32,5,31,5	
BZ198	NT:NST		32,5	14,5
CU385	4,7:P1.19,15		32,4	
MC58	15:P1.7,16		32,9	
NG3/88	8:P1.1		32,9	25,7
NMB	2b:P1.5,2	40,7,39,6	33	14,5
S3446	19,14.P1.23,14		32,9	25,7

⁺Véase texto y notas al pie de página de las Tablas 21 y 22 (más adelante)

FIG. 14A Proteínas accesibles en la superficie bacteriana precipitadas por antisueros agrupados de ratones secuencialmente inmunizados con MV MenC de la cepa RM1090, MV MenB de la cepa BZ198 y VME MenA de la cepa Z1092.

Cepa	Serotipo:subtipo ⁺	Proteínas precipitadas (por masa aparente en kDa)									
		>45		36-45		25-35		<25			
		Expt. 1	Expt. 2	Expt. 1	Expt. 2	Expt. 1	Expt. 2	Expt. 1	Expt. 2		
BZ198	NT:NST	80		36,39,43	37,40	28,30	28	14,5	12		
CU385	4,7:P1.19,15	80		38,42	42	30,34		10	11		
1000	NT:P1.5		NR	41,45	NR	26	NR		NR		

+Véase texto y notas al pie de página de las FIGS. 21 y 22 (más adelante). Expt. 1 y 2 se refiere a experimentos realizados con grupos de suero inmune de diferentes grupos de ratones inmunizados con diferentes preparaciones de vacuna CHORI. NR = no realizado (1000 cepas ensayadas con suero inmune DE grupo de ratones inmunizado).

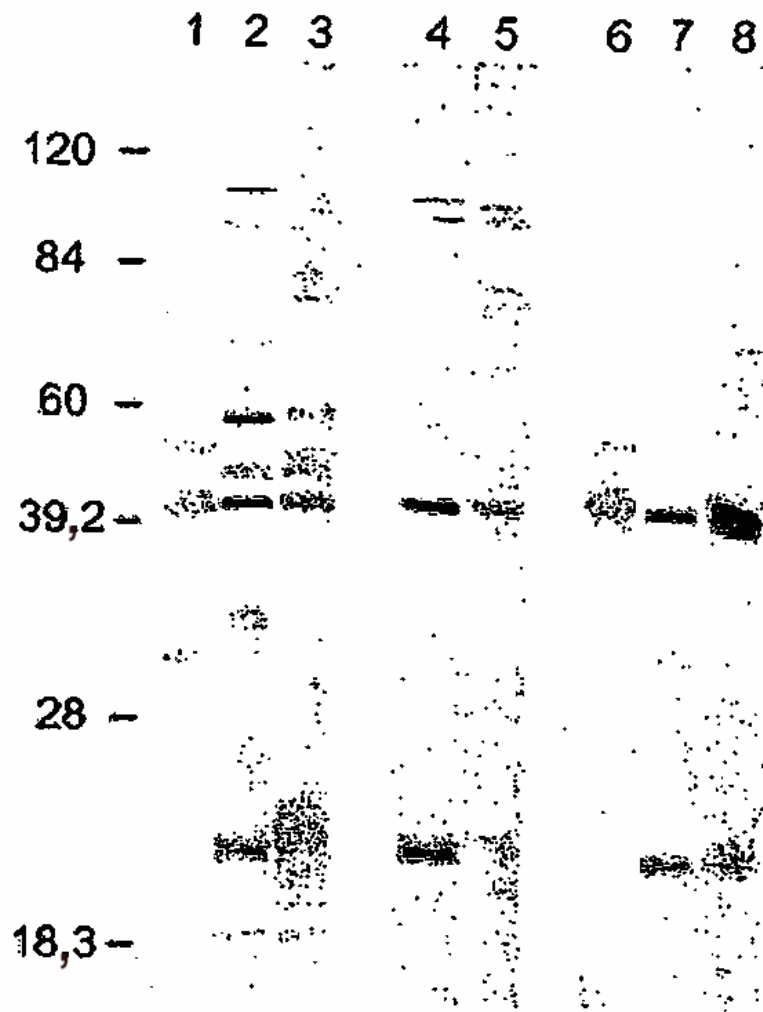


FIG. 15

FIG. 16. Proteínas reactivas con antisueros antigénicos anti-CHORI por transferencia de Western de preparaciones de MV y VME

Antisueros anti-CHORI de ratón/CFA ⁺		Anti-CHORI de ratón Al ₂ (OPO ₃) ₂ ⁺		Antisueros anti-CHORI de cobaya/Al ₂ (OPO ₃) ₂ ⁺⁺			
MV RM1090	MV BZ198	VME Z1092	MV BZ198	VME Z1092	MV RM1090	MV BZ198	VME Z1092
	119			116			
108				107			
101		101	101	99			
	96	97	95	94			
	93	93	91	92			92
		88					
		81		78			
		76					
67	67	69		67	66		76
				64	62		68
53*	56*	57*	56	51	53	55	64
	50	50					59
46*	47*	47*	47	46	47	46	
	36	38				34	46
33*	33*	35*	33	33	32	33	33
	27				24		
	20*	21*	20	21		20	
		19		19	19		
	18*	18*	18	18			19

⁺Véase notas al pie de página y texto de la FIG. 8.

⁺⁺ Véase notas al pie de página y texto de la FIG. 9.

*Indica proteínas más reactivas con antisueros CHORI/CFA y comunes a al menos dos de las tres preparaciones de vacuna.

FIG. 17. Reactividad de antisueros anti-CHORI con LOS por ELISA

Antisueros ⁺	RM1090 LOS (I/título) ⁺⁺		BZ198 LOS (I/título) ⁺⁺		Z1092 LOS (I/título) ⁺⁺	
	No absorbido	Absorbido ⁺⁺⁺⁺	No absorbido	Absorbido ⁺⁺⁺⁺	No absorbido	Absorbido ⁺⁺⁺⁺
Anti-CHORI de ratón	<100	<100	900	<100	150	<100
Mezcla anti-CHORI de ratón	900	100	200	<100	600	100
Anti-CHORI de cobaya	<100	<100	350	100	<100	<100
Mezcla anti-CHORI de cobaya ⁺⁺⁺	<100	<100	300	100	<100	<100

+ Véase notas al pie de página y texto de las FIGS. 8 y 9.

⁺⁺ El título se define como la dilución de suero que proporciona una DO a 405 nm de 0,5 después de una hora de incubación con sustrato.

⁺⁺⁺ Se usa lo mismo para preparar la mezcla de antisueros anti-CHORI de ratón (véase la FIG. 8) excepto que en lugar de 5 microgramos se administró una dosis total de 25 microgramos de proteína.

⁺⁺⁺⁺ Después de incubación con LOS-BSA acoplado a Sepharose (Véase texto).

FIG. 18. Actividad bactericida de antisueros anti-CHORI antes y después de la absorción de anticuerpos anti-LOS.

	Cepa BZ198 (I/título) ⁺		Cepa S3032 (I/título) ⁺	
	No absorbido	Absorbido ⁺⁺	No absorbido	Absorbido ⁺⁺
Suero ⁺⁺⁺	49	28	259	247
Anti-CHORI de ratón	350	111	234	102
MEZCLA anti-CHORI de ratón	125	93	13	5
Anti-CHORI de cobaya	77	31	<5	14

⁺Véase nota al pie de página y texto de la FIG.5.

⁺⁺Después de incubación con LOS-BSA acoplado a Sepharose (Véase texto).

⁺⁺⁺Véase notas al pie de página y texto de la FIG. 17

FIG. 19. Reactividad de AcM producidos por inmunización con vacuna CHORI, con cepas bacterianas, LOS y rNspA por ELISA.

Cepa ⁺	[AcM] (ng/ml) proporcionando una DO a 405 nm = 0,5 después de 1 hora de incubación con sustrato	1D9 (IgG2a)	4B11 (IgM)	9B8 (IgG3)	14C7 (IgG3)	AcM anti-NspA AL4 ⁺⁺⁺ (IgG2a)
Nm 1000	500	>720 ⁺⁺	>3970	7380 ⁺	1000	
Nm 4335	500	>720	13	30	30	
Nm 8047	200	2,4	>3970	10	20	
Nm 8047 ΔNspA	600	>720	>3970	>7380	>5400	
Nm BZ198	600	>720	16	2	20	
Nm BZ198 ΔNspA	600	>720	16	>7380	>5400	
Nm BZ83	600	>720	>3970	273	80	
Nm CU385	600	>720 ⁺⁺	>3970	>7380 ⁺⁺	180	
Nm MI36	600	>720	>3970	36	400	
Nm M3966	1000	>720	>3970	0,5	50	
Nm M986	800	>720	>3970	5	400	
Nm NG3/88	600	0,8	>3970	1	70	
Nm NGE3t	500	>720	>3970	5	100	
Nm NGF26	600	2,4	>3970	0,4	40	
Nm S3446	500	>720	>3970	0,2	40	
Hi Minn A.	>8300	>720	>3970	>7380	NR	
Hi Eagan	>8300	>720	>3970	>7380	NR	
Nm RM1090 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	NR	
Nm BZ198 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	NR	
Nm Z1092 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	NR	
rNspA MV	>8300	>720	>3970	28	6	

⁺Nm., *Neisseria meningitidis*; Hi, *Haemophilus influenzae*
⁺⁺Aunque negativo por ELISA, 14C7 es bactericida para estas cepas (Véase FIG. 20).
⁺⁺⁺Véase Moe et al. Infect Immun. 2001 69: 3762

FIG. 20. Actividad bactericida de AcM producidos por inmunización con la vacuna CHORI.

Cepa (serosubtipo)	PorA heteróloga contra cepas de la vacuna CHORI ⁺	AcM ensayado para la actividad bactericida ⁺⁺					
		1D9	4B11	9B8	14C7	AL12 ⁺⁺	
1000	-	-	+	-	+	+	
BZ198	-	-	estático	+	+	+	
BZ198ΔN spA	-	-	-	+	-	-	
CU385	+	-	+	-	+	-	
M986	-	-	-	-	+	-	
NG3/88	+	-	estático	-	estático	-	

⁺ Véase texto y notas al pie de página de la FIG. 4.

⁺⁺ + se refiere a la actividad bactericida cuando se ensaya a menos de o igual a 100 microgramos/ml; estático se refiere a un porcentaje de supervivencia de UFC/ml a los 60 minutos que es mayor que 50 % pero menor que 100 % (Véase FIG. 6)

⁺⁺⁺ Moe et al. Infect Immun. 2001 69: 3762

FIG. 21. Anticuerpos monoclonales que definen el serotipo y serosubtipo meningocócico disponibles en el RIVM*

Reactivos de serotipificación			Reactivos serosubtipificación		
Monoclonal	Tipo	Ig	Monoclonal	Tipo	Ig
MN3C6B	1	G2b	MN14C2.3	P1.1	G2a
MN2D3F	2A	G2a	MN16C13F4	P1.2	G2a
MN2C3B	2B	G2a	MN20B9.34	P1.4	G2a
MN14G21	4D	G2a	MN22A9.19	P1.1.5	G2a.
MN5C8C	14	G2a	MN19D6.13	P1.6	G3
MN15A14H6	15	G2a	MN14C11.6	P1.7	G2a
			MN5A10F	P1.9	G2a
			MN5A10F	P1.9	G2a
			MN20F4.17	P1.10	G2b
			MN20A7.10	P1.12	G3
			MN24H10.75	P1.13	G2a
			MN21G3.17	P1.14	G3
			MN3C5C	P1.15	G3
			MN5C11G	P1.16	G2b

*Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), P.O. Box 457.3720 AL Bilthoven, Países Bajos (referencia *FEMS Microbiology Letters* 48 (1987) 367-371).

FIG. 22. Anticuerpos monoclonales que definen el serogrupo, serotipo y serosubtipo disponibles en el NIBSC*

Serogrupo	Catálogo n°	Serotipo	Catálogo n°	Serosubtipo	Catálogo n°
A	95/674	P2.2a	95/682	P1.1	95/694
B	95/750	P2.2b	95/684	P1.10	95/710
C	95/678	P3.1	95/680	P1.12	95/712
		P3.14	95/688	P1.13	95/714
		P3.15	95/690	P1.14	95/716
		P3.21	95/692	P1.15	95/718
		P3.4	95/686	P1.16	95/720
				P1.2	95/696
				P1.3	95/698
				P1.4	95/700
				P1.5	95/702
				P1.6	95/704
				P1.7	95/706
				P1.9	95/708

*National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), División de bacteriología, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts., EN6 3QG, Reino Unido