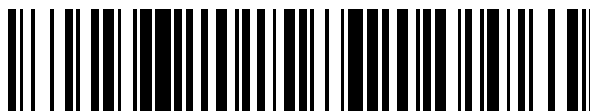


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 392**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/104 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2003 E 10179782 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2258388**

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

30 Prioridad:

30.08.2002 GB 0220194

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

11.11.2014

73 Titular/es:

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

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 520 392 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vesículas de membranas externas bacterianas mejoradas

5 **Campo técnico**

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

10 **Antecedentes de la técnica**

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

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

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

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

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

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

45 **Descripción de la invención**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30 *La bacteria*

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

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

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

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

Rotura de membranas

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

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

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

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

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

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

10 *Las vesículas*

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

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

30 *Componentes inmunógenos bacterianos retenidos*

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

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

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

55 La proteína “287” es descrita como “NMB2132” en la referencia 39 (GenBank AAF42440, 01:7227388). Es descrita también en las referencias 40 y 42. Provoca fuertes anticuerpos bactericidas. La proteína “287” normalmente no está presente en vesículas preparadas mediante métodos basados en detergente de la técnica anterior y, para superar su supresión, ha sido previamente propuesto que las preparaciones de OMV pueden ser complementadas con 287 [43]. Sin embargo, según la presente invención, la “287” puede ser retenida en las vesículas. Estas vesículas de 287^{+ve} son ventajosas porque una combinación de dos potentes inmunógenos (es decir, vesículas +287) es preparada en un único procedimiento, en el que cada inmunógeno aumenta la eficacia del otro.

60 La NspA preferida (a) tiene al menos un a% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos OI:

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

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

Composiciones farmacéuticas inmunógenas

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

La composición de la invención está preferentemente esterilizada.

La composición de la invención está preferentemente exenta de agentes pirógenos.

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

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

La composición comprenderá generalmente un adyuvante. Los adyuvantes preferidos para aumentar la eficacia de la invención incluyen, pero sin limitación: (A) MF59 (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formulados en forma de partículas submicrónicas usando un microfluidizador) [véase el capítulo 10 de la referencia 45; véase también la referencia 46]; (B) micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 nm de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~300 nm de diámetro y lo más preferentemente ~500 nm a ~1000 nm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(ácido-hidroxiácido), un poli(ácido hidroxibutírico) un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), siendo preferido un poli(láctido-co-glicólido) opcionalmente con materiales de carga superficiales (por ejemplo, añadiendo un detergente catiónico, amónico o no iónico como SDS (negativo) o CTAB (positivo) [por ejemplo, referencias 47 y 48]; (C) liposomas [véase los capítulos 13 y 14 de la referencia 45]; (D) ISCOMs [véase el capítulo 45 de la referencia 45], que pueden estar desprovistos de detergentes adicional [49]; (E) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80,5% de polímero L121 de bloques plurónicos y thr-MDP, microfluidizado en forma de una emulsión submicrónica o centrifugado para generar una emulsión de tamaño de partículas mayor [véase el capítulo 12 de la referencia 45]; (F) sistema adyuvante Ribit® (RAS), (Eibi immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de paredes celulares bacterianas del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y estructura principal de las paredes celulares (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox®); (G) adyuvantes de saponina, como QuilA o QS21 [véase el capítulo 22 de la referencia 45] también conocido como estimulon®; (H) quitosano [por ejemplo, 50]; (I) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (J) citoquinas, como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- α y γ), factor de estimulación de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc. [véanse los capítulos 27 y 28 de la referencia 45]; (K) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [51]; (L) monofosforil-lípidoA (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) [por ejemplo, capítulo 21 de la referencia 45]; (M) combinaciones de 3sMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [52]; (N) oligonucleótidos que comprenden restos CpG [53], es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, siendo usada opcionalmente 5- metilcitosina en lugar de citosina; (O) un polioxietileno-éter o un polioxietileno-éster [54]; (P) un tensioactivo de éster de polioxietileno-sorbitán en combinación con un octoxinol [55] o un polioxietileno-álquil-éter o un tensioactivo de éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional como un octoxinol [56]; (Q) un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un poligonucleótido CpG) y una saponina [57]; (R) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica [58]; (S) una saponina y una emulsión de aceite en agua [59]; (T) enterotoxina lábil respecto al calor de *E. coli* ("LT") o sus mutantes destoxificados, como los mutantes K63 o R72 [por ejemplo, capítulo 5 de la referencia 60]; (U) toxina del cólera ("CT") o sus mutantes destoxificados [por ejemplo, capítulo 5 de la referencia 60]; (V) RNA de cadena doble; (W) sales de aluminio, como hidróxidos de aluminio (incluidos los oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluidos los hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc. [Capítulos 8 y 9 de la referencia 61]; (X) emuladores de monofosforil-lípidos A, como derivados de aminoalquil-glucosaminida-fosfato, por ejemplo, RC-529 [62]; (Y)

5 polifosfazeno (PCCPP); o (Z) un bioadhesivo [63] como microesferas de ácido hialurónico esterificado [64] o un mucoadhesivo seleccionado entre el grupo que consiste en derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. Pueden ser usadas también otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para aumentar la eficacia de la composición [por ejemplo, véase el capítulo 7 de la referencia 45]. Las sales de aluminio (especialmente los fosfatos y/o hidróxidos de aluminio) son adyuvantes preferidos para una inmunización parenteral. Las toxinas mutantes son preferidas para los adyuvantes mucosales.

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

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

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

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

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

- 35
- antígenos de *Helicobacter pylori* como CagA [67 a 70], VacA [71, 72], NAP [73, 74, 75], HopX [por ejemplo, 76], HopY [por ejemplo, 76] y/o ureasa.
 - un antígeno de sacárido del serogrupo de *N. meningitidis* A, C, W135 y/o Y, como el oligosacárido descrito en la referencia 77 del serogrupo C [véase también la referencia 78] o el oligosacárido de la referencia 79;
 - un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 80, 81, 82];

40

 - un antígeno del virus de la hepatitis A, como un virus inactivado [por ejemplo, 83, 84];
 - un antígeno del virus de la hepatitis B, como los antígenos de la superficie y/o el núcleo [por ejemplo, 84, 85];
 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, como holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo 86 y 87];

45

 - un antígeno de la difteria como toxoide de difteria [por ejemplo, capítulo 3 de referencia 88] por ejemplo, el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo, 89];
 - un antígeno del tétanos, como un toxoide del tétanos [por ejemplo, capítulo 4 de referencia 108];
 - un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae B* [por ejemplo, 78];

50

 - un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo, 90];
 - un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 91, 92, 93, 94];
 - un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, referencias 95 a 101];
 - un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 102].
 - un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 103];

55

 - antígeno(s) de la polio [por ejemplo, 104, 105] como OPV o, preferentemente, IPV;
 - antígeno(s) de la rabia [por ejemplo, 106] como virus inactivados liofilizados [por ejemplo, 107, RabAvert®];
 - antígenos del sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la referencia 108];
 - antígeno(s) de la gripe [por ejemplo, capítulo 19 de la referencia 108], como las proteínas de superficies de hemaglutinina y/o neuraminidasa;

60

 - un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 109];
 - un antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 110, 111];
 - un antígeno de sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B);
 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo, 111, 112, 113];
 - un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 114];

65

 - un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo, 115, 116, 117];
 - un antígeno de un virus de la familia de las flaviviridae (genero flavivirus), como el virus de la fiebre

amarilla, virus de la encefalitis Japonesa, cuatro serotipos de virus dengue, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas o virus del Nilo occidental;

- un antígeno de pestivirus, como el virus de la fiebre porcina clásica, virus de la diarrea vírica bovina y/o virus de la enfermedad de la frontera;
- un antígeno de parvovirus, por ejemplo, de parvovirus B 19;
- una proteína priónica (por ejemplo, la proteína priónica CJD);
- una proteína amiloide, como un beta-péptido [118];
- un antígeno del cáncer, como los recogidos en la Tabla 1 de la referencia 119 o en las Tablas 3 y 4 de la referencia 120.

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

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

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

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

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

Los antígenos en la composición estarán presentes normalmente a una concentración de al menos 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmune contra ese antígeno.

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

Medicamentos

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

La invención también presenta composiciones como se definen en las reivindicaciones para su uso como un método de obtener una respuesta inmune en un paciente, incluyendo la administración de una composición de la invención a un paciente. La respuesta inmune es, preferiblemente, protectora contra una enfermedad meningocócica, y puede comprender una respuesta inmune humoral y / o una respuesta inmune celular. El paciente es, preferiblemente, un niño.

El método puede obtener una respuesta de fuerza, en un paciente al que ya se ha administrado un cebador contra *N. meningitidis*. Se describen en la ref. 65 pautas de sensibilización y refuerzo subcutáneas e intranasales para VMEs.

La invención también presenta una vesícula de la invención para uso en la fabricación de un medicamento para obtener una respuesta inmune en un paciente. El medicamento es, preferiblemente, una composición inmunogénica (p. ej. una vacuna). El medicamento es, preferiblemente, para prevenir y / o tratar una enfermedad causada por un *Neisseria* (p. ej. *Meningitidis*, *septicaemia*, *gonorrhoea*, etc).

Los métodos y usos de la invención pueden incluir la administración de vesículas de más de un subtipo/serogrupo de *N. meningitidis* [p. ej. Ref 28].

Formulación de OMV

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

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

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

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

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

10 *Definiciones*

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

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

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

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

30 **Breve descripción de los dibujos**

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

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

40 **Modos de llevar a cabo la invención**

Preparación de OMV

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

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

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

65

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

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

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

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

	Formulación "A"	Formulación "B"
OMVs	50 µ/ml	50 µg/ml
Adyuvante de hidróxido de aluminio	3,3 µ.ml	3,3 µg.ml
Sacarosa	3%	-
Tampón de histidina, pH 6,5	-	5 mM
Cloruro de sodio	-	9 mg/ml

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

Se comprenderá que la invención ha sido escrita a modo de ejemplo solamente y que pueden hacerse modificaciones, permaneciendo dentro del alcance de la invención.

Referencias

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

- [23] Solicitud de patente internacional WO99/10497.
 [24] Solicitud de patente internacional WO02/07763.
 [25] Patente europea 0624376.
 5 [26] Claassen et al. (1996) *Vaccine* 14: 1001-1008.
 [27] Peeters et al. (1996) *Vaccine* 14: 1009-1015.
 [28] Solicitud de patente internacional WO02/09643.
 [29] Patente de EE.UU. 6,180,111.
 [30] Solicitud de patente internacional WOOI/34642.
 10 [31] Martin et al. (1997) *J. Exp. Med.* 185: 1173-1183.
 [32] Plante et al. (1999) *Infect. Immun.* 67: 2855-2861.
 [33] Cadieux et al. (1999) *Infect. Immun.* 67: 4955-4959.
 [34] Moe et al. (1999) *Infect. Immun.* 67: 5664-5675.
 [35] Martin et al. (2000) *J. Biotechnol.* 83: 27-31.
 15 [36] Moe et al. (2001) *Infect. Immun.* 69: 3762-3771.
 [37] Solicitud de patente internacional WO96/29412.
 [38] Solicitud de patente internacional WOOO/71725.
 [39] Tettelin et al. (2000) *Science* 287: 1809-1815.
 [40] Solicitud de patente internacional WO99/57280.
 20 [41] Solicitud de patente internacional WO03/020756 (SEQ IDs 1-22 en particular).
 [42] Solicitud de patente internacional WO00/66741.
 [43] Solicitud de patente internacional WO01/52885.
 [44] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
 [45] *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 25 [46] WO90/14837.
 [47] WO02/26212.
 [48] WO98/33487.
 [49] WO00/07621.
 [50] WO99/27960.
 30 [51] WO98/57659.
 [52] Solicitudes de patentes europeas 0835318,0735898 y 0761231.
 [53] Krieg (2000) *Vaccine* 19: 618-622; Krieg (2001) *Curr Opin Mol Ther* 2001 3: 15-24; WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581 etc.
- 35 [54] WO99/52549.
 [55] WO01/2120.
 [56] WO01/21152.
 [57] WO00/6280.
 [58] WO00/23105.
 [59] WO99/11241.
- 40 [60] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, number 1.
 [61] *Vaccine Design* (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 [62] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278.
 [63] Solicitud de patente internacional W000/50078.
 45 [64] Singh et al. (2001) *J. Cont. Rele.* 70: 267-276.
 [65] Bakke et al. (2001) *Infect. Immun.* 69: 5010-5015.
 [66] Katial et al. (2002) *Infect. Immun.* 70: 702-707.
 [67] Covacci y Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19: 587-592.
 [68] WO93/18150.
 50 [69] Covacci et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
 [70] Tummuru et al. (1994) *Infect. Immun.* 61: 1799-1809.
 [71] Marchetti et al. (1998) *Vaccine* 16: 33-37.
 [72] Telford et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179: 1653-1658.
 [73] Evans et al. (1995) *Gene* 153: 123-127.
 55 [74] WO96/01272 y WO96/01273, especialmente SEQ ID NO: 6.
 [75] WO97/25429.
 [76] WO98/04702.
 [77] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10: 691-698.
 [78] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17: 1251-1263.
 [79] Solicitud de patente internacional W003/007985.
 60 [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 331-332.
 [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin NorthAm* 47: 269-285, v.
 [82] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207.
 [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.
 [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103: 321-326.
 65 [85] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl: S63-68 y 79-80.
 [86] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334: 349-355.

- [87] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9: 232-238.
 [88] Vaccines (1988) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 [89] Del Giudice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19: 1-70.
 [90] Hsu et al. (1999) Clin Liver Dis 3: 901-915.
 5 [91] Solicitud de patente internacional WO99/24578.
 [92] Solicitud de patente internacional WO99/36544.
 [93] Solicitud de patente internacional WO99/57280.
 [94] Solicitud de patente internacional WO02/07924.
 [95] Solicitud de patente internacional WO02/02606.
 10 [96] Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21: 385-389.
 [97] Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28: 1397-406.
 [98] Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181 (Suppl 3): S524-S527.
 [99] Solicitud de patente internacional WO99/27105.
 [100] Solicitud de patente internacional WO00/27994.
 15 [101] Solicitud de patente internacional WO00/37494.
 [102] Solicitud de patente internacional WO99/28475.
 [103] Ross et al. (2001) Vaccine 19: 4135-4142.
 [104] Sutter et al. (2000) Pediatric Clin North Am 47: 287-308.
 [105] Zimmerman y Spann (1999) Am Fam Physician 59: 113-118,125-126.
 20 [106] Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl: S2-6.
 [107] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16; 47 (1): 12, 19.
 [108] Vaccines (1988) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 [109] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1: S101-107.
 [110] Schuchat (1999) Lancet 353 (9146): 51-6.
 25 [111] Solicitud de patente internacional WO02/34771.
 [112] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13: 227-43, viii.
 [113] Ferretti et al. (2001) PNAS USA 98: 4658-4663.
 [114] Kuroda et al. (2001) Lancet 357 (9264): 1225-1240; véase también páginas 1218-1219.
 [115] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39: 85-100.
 30 [116] Demicheli et al. (1998) Vaccine 16: 880-884.
 [117] Stepanov et al. (1996) J Biotechnol 44: 155-160.
 [118] Ingram (2001) Trends Neurosci 24: 305-307.
 [119] Rosenberg (2001) Nature 411: 380-384.
 [120] Moingeon (2001) Vaccine 19: 1305-1326.
 35 [121] EP-A-0372501
 [122] EP-A-0378881
 [123] EP-A-0427347
 [124] WO93/17712
 [125] WO94/03208
 40 [126] WO98/58668
 [127] EP-A-0471177
 [128] WO00/56360
 [129] WO91/01146
 [130] WO00/61761
 45 [131] WO00/723
 [132] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
 [133] WO99/24578.
 [134] WO99/36544.
 [135] WO99/57280.
 50 [136] WO00/22430.
 [137] Tettelin et al. (2000) Science 287: 1809-1815.
 [138] WO96/29412.
 [139] Pizza et al. (2000) Science 287: 1816-1820.
 [140] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30.
 55 [141] Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482-489.
 [142] WO03/009869

LISTADOS DE SECUENCIAS

- 60 <110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
 <120> VESÍCULAS DE MEMBRANAS EXTERNAS BACTERIANAS MEJORADAS
 <130> P055400EP
 65 <140> EP

ES 2 520 392 T3

<141> 2002-08-30
 <150> GB 0220194.5
 <151> 2002-08-30
 5 <160> 3
 <170> SeqWin99, version 1.02
 10 <210> 1
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 15 <400> 1

Met Lys Lys Ala Leu Ala Thr Leu Ile Ala Leu Ala Leu Pro Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Glu Gly Ala Ser Gly Phe Tyr Val Gln Ala Asp Ala Ala
 20 20 25 30
 His Ala Lys Ala Ser Ser Ser Leu Gly Ser Ala Lys Gly Phe Ser Pro
 25 35 40 45
 Arg Ile Ser Ala Gly Tyr Arg Ile Asn Asp Leu Arg Phe Ala Val Asp
 30 50 55 60
 Tyr Thr Arg Tyr Lys Asn Tyr Lys Ala Pro Ser Thr Asp Phe Lys Leu
 35 65 70 75 80
 Tyr Ser Ile Gly Ala Ser Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Thr Gln Ser Pro
 40 85 90 95
 Val Lys Pro Tyr Leu Gly Ala Arg Leu Ser Leu Asn Arg Ala Ser Val
 45 100 105 110
 Asp Leu Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Gln Thr Ser Ile Gly Leu Gly
 50 115 120 125
 Val Leu Thr Gly Val Ser Tyr Ala Val Thr Pro Asn Val Asp Leu Asp
 55 130 135 140
 Ala Gly Tyr Arg Tyr Asn Tyr Ile Gly Lys Val Asn Thr Val Lys Asn
 60 145 150 155 160
 Val Arg Ser Gly Glu Leu Ser Val Gly Val Arg Val Lys Phe
 65 165 170

<210> 2
 <211> 488
 50 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 2

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 55 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 60 20 25 30

65

ES 2 520 392 T3

	Thr	Leu	Ser 35	Lys	Pro	Ala	Ala	Pro 40	Val	Val	Ser	Glu	Lys 45	Glu	Thr	Glu
5	Ala	Lys 50	Glu	Asp	Ala	Pro	Gln 55	Ala	Gly	Ser	Gln	Gly 60	Gln	Gly	Ala	Pro
	Ser 65	Ala	Gln	Gly	Ser	Gln 70	Asp	Met	Ala	Ala	Val 75	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr 80
10	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala 85	Val	Thr	Ala	Asp	Asn 90	Pro	Lys	Asn	Glu	Asp 95	Glu
	Val	Ala	Gln	Asn 100	Asp	Met	Pro	Gln	Asn 105	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp 110	Ser	Ser
15	Thr	Pro	Asn 115	His	Thr	Pro	Asp	Pro 120	Asn	Met	Leu	Ala	Gly 125	Asn	Met	Glu
	Asn	Gln 130	Ala	Thr	Asp	Ala	Gly 135	Glu	Ser	Ser	Gln	Pro 140	Ala	Asn	Gln	Pro
20	Asp 145	Met	Ala	Asn	Ala	Ala 150	Asp	Gly	Met	Gln	Gly 155	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala 160
25	Gly	Gly	Gln	Asn	Ala 165	Gly	Asn	Thr	Ala	Ala 170	Gln	Gly	Ala	Asn	Gln 175	Ala
	Gly	Asn	Asn	Gln 180	Ala	Ala	Gly	Ser	Ser 185	Asp	Pro	Ile	Pro	Ala 190	Ser	Asn
30	Pro	Ala	Pro 195	Ala	Asn	Gly	Gly	Ser 200	Asn	Phe	Gly	Arg	Val 205	Asp	Leu	Ala
	Asn	Gly 210	Val	Leu	Ile	Asp	Gly 215	Pro	Ser	Gln	Asn	Ile 220	Thr	Leu	Thr	His
35	Cys 225	Lys	Gly	Asp	Ser	Cys 230	Ser	Gly	Asn	Asn	Phe 235	Leu	Asp	Glu	Glu	Val 240
	Gln	Leu	Lys	Ser	Glu 245	Phe	Glu	Lys	Leu	Ser 250	Asp	Ala	Asp	Lys	Ile 255	Ser
40	Asn	Tyr	Lys	Lys 260	Asp	Gly	Lys	Asn	Asp 265	Lys	Phe	Val	Gly	Leu 270	Val	Ala
45	Asp	Ser	Val 275	Gln	Met	Lys	Gly	Ile 280	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile 285	Phe	Tyr	Lys
	Pro	Lys 290	Pro	Thr	Ser	Phe	Ala 295	Arg	Phe	Arg	Arg	Ser 300	Ala	Arg	Ser	Arg
50	Arg 305	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu 310	Met	Pro	Leu	Ile	Pro 315	Val	Asn	Gln	Ala	Asp 320
	Thr	Leu	Ile	Val	Asp 325	Gly	Glu	Ala	Val	Ser 330	Leu	Thr	Gly	His	Ser 335	Gly
55	Asn	Ile	Phe	Ala 340	Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr 345	Arg	Tyr	Leu	Thr	Tyr 350	Gly	Ala
	Glu	Lys	Leu 355	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr 360	Ala	Leu	Arg	Val	Gln 365	Gly	Glu	Pro
60	Ala	Lys 370	Gly	Glu	Met	Leu	Ala 375	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr 380	Asn	Gly	Glu	Val
65	Leu 385	His	Phe	His	Thr	Glu 390	Asn	Gly	Arg	Pro	Tyr 395	Pro	Thr	Arg	Gly	Arg 400

ES 2 520 392 T3

Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
 405 410 415
 5 Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala
 420 425 430
 Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly
 435 440 445
 10 Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
 450 455 460
 15 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
 465 470 475 480
 Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485

<210> 3
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 3
 25 Met Pro Ser Glu Pro Pro Phe Gly Arg His Leu Ile Phe Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 30 Thr Cys Leu Ile Asp Ala Val Cys Lys Lys Arg Tyr His Asn Gln Asn
 20 25 30
 Val Tyr Ile Leu Ser Ile Leu Arg Met Thr Arg Ser Lys Pro Val Asn
 35 35 40 45
 Arg Thr Ala Phe Cys Cys Leu Ser Leu Thr Thr Ala Leu Ile Leu Thr
 50 55 60
 Ala Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly
 65 70 75 80
 40 Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu
 85 90 95
 Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys
 100 105 110
 45 Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu
 115 120 125
 Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile
 130 135 140
 50 Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu
 145 150 155 160
 Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr
 165 170 175
 55 Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg
 180 185 190
 Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys
 195 200 205
 60 Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser
 210 215 220
 65 Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys
 225 230 235 240

ES 2 520 392 T3

	Gln	Gly	Asn	Gly	Lys	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Ser	Pro	Glu	Leu	Asn	Val
					245					250					255	
5	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	His	Ala	Val
			260						265					270		
	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Gln	Ala	Glu	Lys	Gly	Ser	Tyr	Ser
			275					280					285			
10	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Lys	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ala	Glu
		290					295					300				
	Val	Lys	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala	Lys	Gln
	305					310					315					320
15																
20																
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la fabricación de una preparación de vesícula de membrana externa de una bacteria Gram-negativa recombinante que sobreexpresa el inmunógeno 287, en el que la membrana bacteriana se interrumpe sustancialmente en ausencia de detergente de desoxicolato.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la membrana bacteriana se interrumpe sustancialmente en ausencia de cualquier detergente.
- 10 3. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas básicas: (a) tratar células bacterianas en ausencia sustancial de detergente; (b) centrifugar la composición de la etapa (a) para separar las vesículas de membrana externa de las células tratadas y los residuos celulares, y recoger el sobrenadante; (c) realizar una centrifugación del sobrenadante de la etapa (b) a alta velocidad y recoger las vesículas de membrana externa en un pellet; (d) redispersar el sedimento de la etapa (c) en un tampón; (e) realizar una segunda centrifugación a alta velocidad según la etapa (c), recoger las vesículas de membrana externa en un sedimento; (f) volver a dispersar el sedimento de la etapa (e) en un medio acuoso.
- 15 4. El proceso de la reivindicación 3, que comprende, además, las etapas siguientes: (g) realizar una filtración estéril a través de, al menos, dos filtros de tamaño de poro decreciente de la composición redispersada de la etapa (f); y (h) opcionalmente, incluir la composición de la etapa (g) en un vehículo farmacéuticamente aceptable y / o una composición adyuvante.
- 20 5. El proceso de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que la etapa (b) comprende una centrifugación a alrededor de 5000 a 10000 g como máximo 1 hora, y los pasos (c) y (e) comprenden una centrifugación a alrededor de 35000 hasta 100000 g como máximo 2 horas.
- 25 6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la ruptura de la membrana se lleva a cabo mediante sonicación, homogeneización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, trituración, prensa francesa, homogeneización, o cualquier otra técnica física.
- 30 7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tampón usado en la etapa (d) y / o en la etapa (f) es un tampón Tris, un tampón fosfato, o un tampón de histidina.
- 35 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la etapa (g) finaliza con un filtro de tamaño de poro de alrededor de 0.2 μm .
- 40 9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la bacteria de la que se preparan las VME es del género *Moraxella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Helicobacter* o *Neisseria*.
- 45 10. El proceso de la reivindicación 9, en el que la bacteria es *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*.
11. El proceso de la reivindicación 10, en el que la bacteria es *N. meningitidis* del serogrupo B.
12. El proceso de la reivindicación 11, en el que la bacteria es la cepa MC58, 2996, H4476 o 394 / 98.
- 50 13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, la etapa de formular una cantidad inmunológicamente eficaz de las VME como una composición inmunogénica.
14. Una composición de VME obtenible por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
15. La composición de la reivindicación 14, que comprende, además, un adyuvante.
16. La composición de la reivindicación 15, que comprende fosfato de aluminio y / o adyuvante de hidróxido (s).
- 55 17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para su uso como un medicamento.
18. El uso de una composición de vesículas de membrana externa de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 en la fabricación de un medicamento para aumentar una respuesta inmune en un paciente.

FIGURA 1

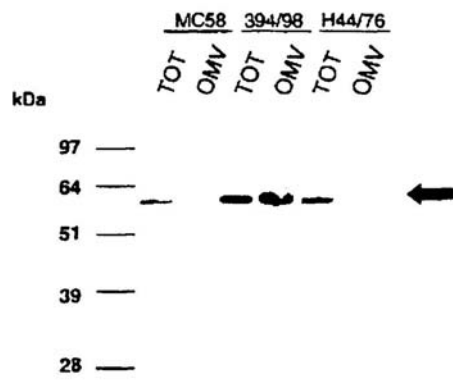


FIGURA 2

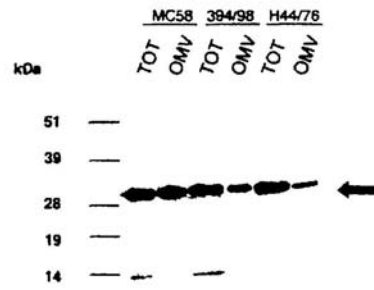


FIGURA 3

GI 7227128:

MPSEPPFGRH LIFASLYCLI DAVCKKRTM QNVYILSILR MTRSKPVMRT AFCLSLTYA
 LILYACSSGG GGYAADIGAG LADALYAPLD HKDNGLQSLY LDQSVRRNEK LKLAAGGAEK
 TYMGDSLNT GKLNQKVSF FDFIRQIEVD QQLITLESGE FQVYKQSHSA LYAFQTEQIQ
 DSEHSGRWVA KRQFRIGDIA GHEYSIDKLP EGGRATYRGT AFGSDDAGGR LTYTIDFAAK
 QGHGKLEHLK SPELWVDLAA ADIKPDGKRH AVISGSLVLY QAERKGSYSLG IPGGKAQEVA
 GSAEVKTVNG IRHIGLAAKQ

GI 7227388:

MPKRSVIAMA CIFALSACGG GGGGSPVKS ADTISKPAAP VVSEKREAK EDAPQAGSQG
 QGAPSAQGSQ DHAIVSEKWT GNGGAVPADN PKMDEVAQH DMPQNAAGTD SSTPNHTPOP
 NMLAGMENEQ ATDAGESSQP ANQPDNAMA DGMQGDPSA GGQNAQNTAA QGAMQAGRMQ
 AAGSSDPIPA SFPAPANGGS NFGKVDLNG VLDGSPQMI TLTCKKQDSC SQMFLDEIV
 QLESEFEKLS DADKISHYK DGMDEKIVGL VADSVQMEGI NQYIIFTKPK PYSFARFRS
 ARSRRLPAE HPLIPVQAD TLIVDGEAVS LTGHSQHIFA PECHTRYLTY GAELKPGGSY
 ALRVQGEPAK GMLAGAAVY NGEVLEFSTE NGRPYPTGR FAAKVDVFSK SVDGIIDSGD
 DLWGTQKFK AALDGMGFKG TWTZNGSDV SGRUYGPAGE EVAGKYSYRP YDAERKGGVY
 FAGKKEQD

GI 1518522:

MEKALATLIA LALPAALAE GASGFTVQAD AAHAKASSL GSANGFSPRI SAGYRINDLR
 FAVDITRYKH YKAPSTDYKL YSIGASAITD FDTQSPVYKY LGARLSLWRA SVDLGSDSP
 SQTISGLGLV TGVSYAVTPN VDLDAQIRYH YIGKVNPKH VRSGLSVGV RVEF