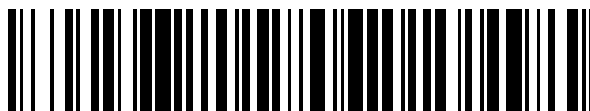


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 859**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2005** **E 05782411 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014** **EP 1784213**

54 Título: **Mejoras referentes a vesículas de membrana externa meningocócicas**

30 Prioridad:

03.09.2004 GB 0419627

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.01.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)
VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT**

72 Inventor/es:

**OSTER, PHILIPP;
RAPPUOLI, RINO y
PIZZA, MARIAGRAZIA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 527 859 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

Mejoras referentes a vesículas de membrana externa meningocócicas

5 Todos los documentos citados en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

10 La presente invención está en el campo de las vesículas de membrana externa meningocócicas para fines de inmunización.

TÉCNICA ANTERIOR

15 Uno de los diversos enfoques para inmunizar contra infección por *Neisseria meningitidis* (meningococo) es usar vesículas de membrana externa (VME). Se ha producido una vacuna de VME eficaz contra el serogrupo B por el Instituto Nacional Noruego de Salud Pública ['MenBvac™'; por ejemplo, ref. 1] pero, aunque esta vacuna es segura y previene la enfermedad MenB, la eficacia es limitada para el serotipo homólogo usado para preparar la vacuna.

20 La vacuna 'RIVM' se basa en VME que contienen seis subtipos PorA diferentes. Se ha mostrado que es inmunogénica en niños en ensayos clínicos de fase II [2].

25 La referencia 3 desvela una vacuna contra diferentes serotipos patógenos de meningococo del serogrupo B basada en VME que retienen un complejo de proteína de 65 kDa. La referencia 4 desvela una vacuna que comprende VME de cepas meningocócicas genéticamente manipuladas, comprendiendo las VME: al menos una proteína de membrana externa de clase 1 (PME), pero que no comprende una PME de clase 2/3. La referencia 5 desvela VME que comprenden PME que tienen mutaciones en sus bucles de superficie y VME que comprenden derivados de lipopolisacárido (LPS) meningocócico. La referencia 6 desvela un procedimiento de preparación de vacunas basadas en VME para meningococo del serogrupo A.

30 Ha habido diversas propuestas para mejorar la eficacia de VME. La referencia 7 desvela composiciones que comprenden VME complementadas con proteínas de unión a transferrina (por ejemplo, TbpA y TbpB) y/o Cu,Zn-superóxido dismutasa. La referencia 8 desvela composiciones que comprenden VME complementadas por diversas proteínas. La referencia 9 desvela preparaciones de vesículas de membrana obtenidas de *N. meningitidis* con un gen *fur* modificado. La referencia 26 enseña que la expresión de *nspA* debe regularse por incremento con inactivación concomitante de *porA* y *cps*. Mutantes adicionalmente inactivados de *N. meningitidis* para la producción de VME se desvelan en las referencias 26 a 28. A diferencia de estos intentos por mejorar las VME cambiando patrones de expresión, la referencia 29 se basa en cambiar los procedimientos para la preparación de VME, y enseña que antígenos tales como NspA pueden ser retenidos durante la extracción de vesículas evitando el uso de detergentes tales como desoxicolato.

40 El fracaso de las VME meningocócicas en provocar protección cruzada contra serotipos no homólogos limita su uso como vacunas generales, pero puede ser muy útil en situaciones epidémicas en las que la enfermedad se caracteriza por cepas patógenas que son esencialmente clónicas. Así, la vacuna del Instituto Finlay (VA-MENGOC-BC™) ha sido útil en América Latina, en la que la enfermedad del serogrupo B ha sido dominada por el serotipo P1.19,15, pero no ha sido eficaz en ninguna parte [10]. Similarmente, la vacuna MeNZB™ de Chiron se ha dirigido a la cepa epidémica (P1.7b,4, conocida como P1.7-2,4 por la actual nomenclatura), que ha sido prevalente en Nueva Zelanda desde 1991.

50 La referencia 11 desvela una vacuna que comprende composiciones en ampolla meningocócicas multivalentes que comprenden una primera ampolla derivada de una cepa meningocócica con un serosubtipo prevalente en un país en uso y una segunda ampolla derivada de una cepa que no necesita tener un serosubtipo predominante en un país de uso.

55 Es un objetivo de la invención proporcionar preparaciones de VME meningocócicas adicionales y mejoradas.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

60 La experiencia con MeNZB™ ha mostrado que las VME dirigidas contra cepas epidémicas específicas pueden ser altamente eficaces en controlar brotes localizados de enfermedad. En combinación con técnicas de fabricación a gran escala y reproducibles, una vacuna puede producirse rápidamente después de un brote. Así, la invención proporciona un procedimiento de preparación de una vacuna de vesículas de membrana externa (VME) meningocócicas que comprende las etapas de: (i) identificar el serosubtipo de una cepa meningocócica asociada a un brote de meningitis meningocócica; (ii) preparar VME a partir de una cepa meningocócica que tiene el serosubtipo identificado en la etapa (i) para su uso en la fabricación de vacunas. El procedimiento puede comprender una o ambas de las etapas adicionales de: (iii) formular dichas VME como vacuna; y (iv) distribuir dicha vacuna en un área geográfica afectada por o probablemente que va a afectarse por dicho brote. La invención también proporciona el

mismo procedimiento, pero omitiendo la etapa (i), para situaciones en las que el serosubtipo relevante ya ha sido identificado. La cepa meningocócica normalmente estará en el serogrupo B, pero puede estar en su lugar en el serogrupo A, C, W135, Y, etc.

- 5 La experiencia con MeNZB™ también ha sugerido a los inventores que las VME serán útiles para inmunizar contra los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, tanto solos como en combinación, y que éstas podrían ser más baratos de fabricar que las vacunas de conjugado actualmente propuestas. Así, la invención proporciona: (a) una composición que comprende vesículas de membrana externa de una cepa del serogrupo C de meningococo; (b) una
10 composición que comprende vesículas de membrana externa de una cepa del serogrupo W135 de meningococo; (c) una composición que comprende vesículas de membrana externa de una cepa del serogrupo Y de meningococo; y (d) una composición que comprende vesículas de membrana externa de dos o más de los serogrupos A, B, C, W135 e Y de meningococo. Dentro de (d), composiciones preferidas incluyen las siguientes mezclas de serogrupos: A+B; A+C; A+W135; A+Y; B+C; B+W135; B+Y; C+W135; C+Y; W135+Y; A+B+C; A+B+W135; A+B+Y; A+C+W135; A+C+Y; A+W135+Y; B+C+W135; B+C+Y; C+W135+Y; A+B+C+W135; A+B+C+Y; B+C+W135+Y; y
15 A+B+C+W135+Y.

Debido a que los antígenos sub-capsulares son compartidos entre serogrupos, entonces las VME (y mezclas de VME) pueden proteger contra más de solamente el serogrupo a partir del cual que se preparan. Por ejemplo, los antígenos sub-capsulares de las cepas del serogrupo A y W135 observados en el África subsahariana son
20 compartidos con las cepas del serogrupo C e Y observadas en cualquier parte en el mundo. Así, la invención proporciona el uso de VME de una cepa meningocócica en un primer serogrupo para proteger contra una o más cepas meningocócicas en un segundo serogrupo, en el que dicho primer y segundo serogrupos son diferentes. Las cepas comparten preferentemente antígenos sub-capsulares, y pueden tener el mismo subtipo, serosubtipo y/o inmunotipo, aún cuando tengan serogrupos diferentes. Se prefiere una mezcla de VME de los serogrupos A y W135,
25 ya que es una mezcla de VME de los serogrupos C e Y.

La experiencia con MeNZB™ también ha sugerido a los inventores que una mezcla de VME de las cepas usadas para las VME de Nueva Zelanda, las VME de Noruega y las VME cubanas sería útilmente eficaz. Así, la invención proporciona una composición que comprende vesículas de membrana externa de dos o tres de: (i) un meningococo del serosubtipo P1.7b,4; (ii) un meningococo del serosubtipo P1.7,16; y (iii) un meningococo del serosubtipo P1.9,15. Las diferentes VME están preferentemente en mezcla pero, alternativamente, pueden estar en recipientes separados dentro de un kit.

En la combinación de VME de diferentes serosubtipos, los inventores han encontrado que las dosis para serosubtipos individuales pueden reducirse sin pérdida de eficacia. Aunque VA-MENGOC-B™ contiene 50 µg de VME (0,5 ml de volumen), HexaMen™ incluye aproximadamente 1 mg de VME (0,3 ml de volumen), y tanto MenBVac™ como MeNZB™ contienen 25 µg de VME (0,5 ml de volumen), medidos como proteína total, los inventores han encontrado que la dosis de VME individuales puede reducirse cuando se usa una mezcla sin pérdida de eficacia individual. Así, la invención proporciona una composición que comprende vesículas de membrana
40 externa de un primer serosubtipo meningocócico y un segundo serosubtipo meningocócico, en la que la concentración de VME del primer serosubtipo es inferior a 45 µg/ml y la concentración de VME del segundo serosubtipo es inferior a 45 µg/ml. La invención también proporciona una composición que comprende vesículas de membrana externa de al menos dos serosubtipos meningocócicos, en la que la concentración combinada de VME es inferior a 90 µg/ml. La invención también proporciona una composición que comprende vesículas de membrana
45 externa de n serosubtipos meningocócicos diferentes, en la que la concentración de VME de cada uno de los n serosubtipos es inferior a 45 µg/ml (es decir, una dosis de VME total inferior a $45n$ µg/ml). El valor de n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc.

La invención también proporciona un kit que comprende VME preparadas a partir de n serosubtipos diferentes. Las vesículas pueden mantenerse y guardarse por separado en el kit hasta que se requieran para ser usadas juntas, por ejemplo, como una mezcla, o para uso separado simultáneo o secuencial. Similarmente, la invención proporciona un procedimiento que comprende: preparar n conjuntos de VME, uno de cada uno de los n serosubtipos diferentes; y combinar los n conjuntos de vesículas. Los diferentes conjuntos pueden combinarse en un kit o en una mezcla.

55 La invención también proporciona una composición que comprende VME preparadas a partir de una cepa meningocócica del serogrupo B que tiene un serosubtipo P1.7b,4, en la que la concentración de VME en la composición es aproximadamente 50 µg/ml. La composición incluye preferentemente un adyuvante de hidróxido de aluminio y un tampón de histidina. La composición puede administrarse en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml.

60 **Las vesículas**

La invención se basa en vesículas de membrana externa (VME) preparadas a partir de *Neisseria meningitidis*. El término "VME" incluye cualquier vesícula proteoliposómica obtenida rompiendo una membrana externa bacteriana para formar vesículas de membrana externa que incluyen componentes de proteína de la membrana externa. Las VME se preparan artificialmente a partir de bacterias (por ejemplo, por tratamiento con detergente, o por medio sin

detergente [29]). El término también engloba ampollas, microvesículas (MV [12]) y 'VME nativas' ('VMEN' [13]), que son vesículas de membrana que se producen naturalmente que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y son liberadas en medio de cultivo. Las MV pueden obtenerse cultivando *Neisseria* en medio de cultivo de caldo, separando las células completas de las MV más pequeñas en el medio de cultivo de caldo (por ejemplo, por filtración o por centrifugación a baja velocidad para sedimentar solo las células y no las vesículas más pequeñas), y a continuación recogiendo las MV del medio empobrecido en células (por ejemplo, por filtración, por precipitación diferencial o agregación de MV, por centrifugación a alta velocidad para sedimentar las MV). Cepas para su uso en la producción de MV pueden seleccionarse generalmente basándose en la cantidad de MV producidas en cultivo, por ejemplo, las ref. 14 y 15 describen *Neisseria* con alta producción de MV.

Las VME pueden prepararse de diversas formas. Procedimientos de obtención de preparaciones adecuadas se desvelan en, por ejemplo, las referencias citadas en el presente documento. Técnicas para formar VME incluyen tratar bacterias con un detergente de sal de ácido biliar (por ejemplo, sales de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc., siendo el desoxicolato de sodio [16 y 17] preferido para tratar *Neisseria*) a un pH suficientemente alto para no precipitar el detergente [6]. Pueden realizarse otras técnicas sustancialmente en ausencia de detergente [29] usando técnicas tales como sonicación, homogeneización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, molienda, prensa francesa, combinación, etc.

Un procedimiento preferido para la preparación de VME implica ultrafiltración [18] en lugar de centrifugación a alta velocidad en VME en bruto. Esto permite cantidades mucho mayores de sobrenadante que contiene VME que van a procesarse en un tiempo mucho más corto (normalmente >15 litros en 4 horas, en comparación con <1,5 litros en 10 horas), y evita la necesidad de redispersar VME después de la centrifugación. La ultracentrifugación permite preparar grandes cantidades de VME mucho más fácilmente, y permite la rápida producción de VME de una cepa de elección, para su uso en la preparación de vacunas.

Cepas meningocócicas usadas para la preparación de vacunas

La identificación del serosubtipo de una cepa meningocócica de interés puede lograrse usando técnicas convencionales, basadas en la proteína de membrana externa porina de clase I (PorA). Una vez se ha determinado un serosubtipo, entonces es rutinario buscar otras cepas conocidas que comparten el mismo serosubtipo. Las otras cepas pueden compartir serogrupo y/o serotipo (PorB) con la primera cepa, pero esto no era necesariamente el caso. En general, sin embargo, se prefiere hacer coincidir tanto el serogrupo como el serosubtipo.

Las cepas meningocócicas usadas según la invención estarán generalmente en uno de los siguientes serogrupos: A, B, C, W135 o Y.

Las cepas meningocócicas usadas según la invención no serán generalmente cepas que expresen múltiples serosubtipos (es decir, alelos de PorA múltiples). Así, bacterias preferidas para su uso con la invención expresarán una única secuencia de PorA, es decir, serán de un único serosubtipo.

También es posible usar cepas en las que PorA se ha regulado por disminución, por ejemplo, en las que la cantidad de PorA se ha reducido al menos el 20 % (por ejemplo, ≥ 30 %, ≥ 40 %, ≥ 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 %, ≥ 95 %, etc.), o incluso inactivado, con respecto a niveles naturales (por ejemplo, con respecto a la cepa H44/76, como se ha desvelado en la referencia 11).

Los meningococos usados según la invención pueden ser de cualquier serotipo (por ejemplo 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.) y/o de cualquier inmunotipo (por ejemplo, L1; L3.3.7; L10; etc.). Los meningococos pueden ser de cualquier linaje adecuado, que incluye linajes hiperinvasivos e hipervirulentos, por ejemplo, cualquiera de los siete siguientes linajes hipervirulentos: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complejo ET-5; complejo ET-37; agrupación A4; linaje 3. Estos linajes se han definido por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero también se ha usado tipado de secuencias multilocus (MLST) para clasificar meningococos [ref. 19], por ejemplo, el complejo ET-37 es el complejo ST-11 por MLST, el complejo ET-5 es ST-32 (ET-5), el linaje 3 es ST-41/44, etc.

Los meningococos pueden tener una o más mutaciones inactivadas de gen(es). Para reducir la actividad pirogénica, por ejemplo, la bacteria debe tener bajos niveles de endotoxina (LPS), y esto puede lograrse por inactivación de las enzimas que participan en la biosíntesis de LPS. Ya se conocen bacterias mutantes adecuadas, por ejemplo, *Neisseria* mutante [20,21] y *Helicobacter* mutante [22]. Procedimientos para preparar membranas externas empobrecidas en LPS de bacterias Gram-negativas se desvelan en la referencia 23.

Además de regular por disminución la expresión de proteínas específicas, la bacteria puede expresar en exceso (con respecto a la cepa natural correspondiente) inmunógenos tales como NspA, proteína 287 [8], proteína 741 [30], TbpA [7], TbpB [7], superóxido dismutasa [7], etc.

Además de tener inactivaciones de genes endógenos particulares, la bacteria puede expresar uno o más genes que no son endógenos. Por ejemplo, la invención puede usar una cepa recombinante que expresa nuevos genes con

respecto a la cepa natural correspondiente. La expresión de genes no endógenos puede lograrse de esta forma por diversas técnicas, por ejemplo, inserción cromosómica (como se usa para introducir múltiples genes *PorA* [24]), mutaciones de inactivación, expresión de vectores extra-cromosómicos (por ejemplo, de plásmidos), etc.

- 5 La bacteria también puede incluir una o más de mutaciones de inactivación y/o de expresión en exceso desveladas en las referencias 25 a 30. Genes preferidos para la regulación por disminución y/o inactivación incluyen: (a) *Cps*, *CtrlA*, *CtrlB*, *CtrlC*, *CtrlD*, *Frpb*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* y/o *TbpB* [25]; (b) *CtrlA*, *CtrlB*, *CtrlC*, *CtrlD*, *Frpb*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PhoP*, *PilC*, *PmrE*, *PmrF*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* y/o *TbpB* [26]; (c) *ExbB*, *ExbD*, *rmpM*, *CtrlA*, *CtrlB*, *CtrlD*, *GalE*, *LbpA*, *LbpB*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* y/o *TbpB* [27]; y (d) *CtrlA*, *CtrlB*, *CtrlD*, *Frpb*, *OpA*, *OpC*, *PilC*, *PorB*, *SiaD*, *SynA*, *SynB* y/o *SynC* [28].

- Además de combinar VME basadas en diferentes serosubtipos, pueden prepararse combinaciones según otros criterios. Criterios de ejemplo incluyen: serotipo (*PorB*, PME de clase 2 ó 3); inmunotipo (lipopolisacárido o lipooligosacárido); origen geográfico de las cepas; prevalencia local de cepas clínicas; linaje hipervirulento, por ejemplo, dos o más de subgrupos I, III y IV-1, complejo ET-5, complejo ET-37, agrupación A4 y linaje 3; tipo de secuencia multilocus (MLST) [19]; más de una de las tres variantes de NMB1870 diferentes [31].

Dosificación de VME

- 20 Las vacunas de VME meningocócicas existentes ofrecen orientación farmacéutica, posológica y de formulación para realizar la invención. Por ejemplo, VA-MENGOC-BC™ es una suspensión inyectable en 0,5 ml que contiene 50 µg de VME de la cepa Cu-385-83 y 50 µg de polisacárido capsular del serogrupo C, absorbida en 2 mg de un gel de hidróxido de aluminio, más 0,01 % de tiomersal y tampón fosfato. MenZB™ también es una suspensión de 0,5 ml y
- 25 contiene 25 µg de VME de la cepa NZ98/254 adsorbida sobre 1,65 mg de un adyuvante de hidróxido de aluminio, con un tampón de histidina y cloruro sódico. MenBvac es similar a MenZB™, pero se prepara a partir de la cepa 44/76.

- 30 La concentración de VME para cada subtipo será suficientemente alta para proporcionar inmunidad protectora después de la administración a un paciente. La concentración de VME en composiciones de la invención será generalmente entre 10 y 500 µg/ml, preferentemente entre 25 y 200 µg/ml, y más preferentemente aproximadamente 50 µg/ml o aproximadamente 100 µg/ml (expresados en términos de proteína total en las VME).

- 35 Sin embargo, si una composición incluye VME de más de un serosubtipo meningocócico, los inventores han encontrado que las dosis para serosubtipos individuales pueden reducirse sin pérdida de eficacia. En particular, la dosis de los subtipos Nueva Zelanda y Noruega puede dividirse a la mitad de 25 µg a 12,5 µg en una dosis de 0,5 ml sin pérdida de inmunogenicidad. Así, una composición de la invención con vesículas de membrana externa de más de un subtipo meningocócico puede incluir menos de 100 µg/ml, que se esperaría a priori que se basara en la simple mezcla de MenBvac™ y MenZB™, y se esperaría a priori que menos de 150 µg/ml se basara en la simple mezcla
- 40 de VA-MENGOC-BC™ con tanto MenBvac™ como MenZB™. Así, tales composiciones de la invención tendrán una concentración de VME combinada de no más de 90 µg/ml (por ejemplo, no más de 80 µg/ml, 70 µg/ml, 60 µg/ml, 50 µg/ml, 40 µg/ml, 30 µg/ml, o incluso menos).

- 45 Más generalmente, si una composición incluye vesículas de membrana externa de *n* subtipos meningocócicos diferentes, la concentración de VME de cada uno de los subtipos es inferior a 45 µg/ml (por ejemplo, inferior a 40 µg/ml, 35 µg/ml, 30 µg/ml, 25 µg/ml, 20 µg/ml, o incluso menos). Se prefiere una concentración de aproximadamente 25 µg/ml.

- 50 Si una composición incluye vesículas de membrana externa de *n* subtipos meningocócicos diferentes, la cantidad de VME para cada subtipo está preferentemente dentro de $\pm 10\%$ de cada otro, es decir, la composición incluye masas sustancialmente iguales de cada VME. En algunas circunstancias, sin embargo, la cantidad de un subtipo puede ser aproximadamente *x* veces superior a la cantidad de otro subtipo, si *x* es 2, 3 ó 4, por ejemplo, la composición podría incluir una dosis doble de un subtipo con respecto a otro(s) subtipo(s) en la composición.

Composiciones farmacéuticas que contienen VME

- 55 Las composiciones de la invención pueden ser composiciones farmacéuticas que incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden prepararse usando un procedimiento que comprende la etapa de mezclar VME con el vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 60 'Vehículos farmacéuticamente aceptables' típicos incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Vehículos adecuados son normalmente grandes macromoléculas lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos
- 65 (tales como gotitas de aceite o liposomas). Tales vehículos son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc.

Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH, sacarosa y similares. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato sin pirógenos estéril es un vehículo típico (por ejemplo, basado en el agua para inyección). Una discusión minuciosa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 32.

Las composiciones de la invención normalmente estarán en forma acuosa (por ejemplo, disoluciones o suspensiones) en vez de en una forma seca (por ejemplo, liofilizada). También son adecuadas composiciones acuosas para reconstituir otras vacunas de una forma liofilizada (por ejemplo, una vacuna conjugada de Hib liofilizada, una vacuna conjugada meningocócica liofilizada, etc.). Si una composición de la invención va a usarse para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit, que puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa precargada y un vial, usándose los contenidos acuosos de la jeringa para reactivar los contenidos secos del vial antes de la inyección.

Las composiciones de la invención pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringas precargadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Las composiciones pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de múltiples dosis. Una jeringa generalmente incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis única o múltiples dosis. Por tanto, para formas de múltiples dosis se prefieren viales a jeringas precargadas.

Los volúmenes de dosificación eficaz pueden establecerse rutinariamente, pero una dosis humana típica de la composición tiene un volumen de aproximadamente 0,5 ml, por ejemplo, para inyección intramuscular. La vacuna basada en VME de RIVM se administró en un volumen de 0,5 ml [33] por inyección intramuscular al muslo o brazo. MeNZB™ se administra en 0,5 ml por inyección intramuscular al muslo anterolateral o la región deltoide del brazo. Pueden usarse dosis similares para otras vías de administración, por ejemplo, una vacuna basada en VME intranasal para atomización puede tener un volumen de aproximadamente 100 µl o aproximadamente 130 µl por pulverización [13], administrándose cuatro pulverizaciones para dar una dosis total de aproximadamente 0,5 ml.

El pH de la composición es preferentemente entre 6 y 8, y más preferentemente entre 6,5 y 7,5 (por ejemplo aproximadamente 7). El pH de la vacuna basada en VME de RIVM es 7,4 [34], y se prefiere un pH <7,5 para composiciones de la invención. Puede mantenerse un pH estable por el uso de un tampón, por ejemplo, un tampón Tris, un tampón fosfato o un tampón de histidina. Las composiciones de la invención incluirán generalmente un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [35], por ejemplo, a entre 1-10 mM, preferentemente aproximadamente 5 mM. La vacuna basada en VME de RIVM mantiene el pH usando un tampón Tris/HCl 10 mM. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y son más preferentemente composiciones de vacuna. Las vacunas según la invención pueden tanto ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) como terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), además de cualquier otro componente, según se necesite. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz' se indica que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que va a tratarse, edad, el grupo taxonómico del individuo que va a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico que trata la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. El contenido de antígeno de las composiciones de la invención se expresará generalmente en términos de la cantidad de proteína por dosis. Una dosis de aproximadamente 0,9 mg de proteína por ml es típica para las vacunas intranasales basadas en VME [13].

Los meningococos afectan diversas áreas del cuerpo y así las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones. La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o espray. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como espray, gotas, gel o polvo [por ejemplo, ref. 36 y 37]. Los inyectables para administración intramuscular son típicos.

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se envasan en formato de múltiples dosis. Antimicrobianos tales como tiomersal y 2-fenoxietanol se encuentran comúnmente en vacunas, pero se prefiere usar tanto un conservante libre de mercurio como no usar en absoluto un conservante.

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

Las composiciones de la invención pueden incluir detergente residual (por ejemplo, desoxicolato) de preparación de

VME. La cantidad de detergente residual es preferentemente inferior a 0,4 µg (más preferentemente inferior a 0,2 µg) por cada µg de proteína.

5 Las composiciones de la invención pueden incluir LPS de meningococo. La cantidad de LPS es preferentemente inferior a 0,12 µg (más preferentemente inferior a 0,05 µg) por cada µg de proteína. Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro sódico) para dar tonicidad. Es típica una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl. La concentración de cloruro sódico es preferentemente aproximadamente 9 mg/ml.

10 Las composiciones de la invención se administrarán generalmente conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán normalmente uno o más adyuvantes, y la invención proporciona un procedimiento de preparación de una composición de la invención, que comprende la etapa de mezclar vesículas de la invención con un adyuvante, por ejemplo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a:

15 A. Composiciones que contienen mineral

Las composiciones que contienen mineral adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 38], o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen mineral también pueden formularse como partícula de sal metálica [39].

25 Un adyuvante de fosfato de aluminio típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con la relación molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida 0,6 mg de Al^{3+} /ml. Puede usarse adsorción con una baja dosis de fosfato de aluminio, por ejemplo, entre 50 y 100 µg de Al^{3+} por dosis. Si se usa un fosfato de aluminio y se desea no adsorber un antígeno al adyuvante, esto se favorece incluyendo iones de fosfato libres en disolución (por ejemplo, por el uso de un tampón fosfato).

30 La vacuna de RIVM se probó con adsorción a tanto un adyuvante de fosfato de aluminio como uno de hidróxido de aluminio, y se encontró que el adyuvante de fosfato de aluminio daba resultados superiores [34]. Los productos MeNZB™, MenBvac™ y VA-MENINGOC-BC™ incluyen todos un adyuvante de hidróxido de aluminio.

35 Una dosis típica de adyuvante de aluminio es aproximadamente 3,3 mg/ml (expresados como concentración de Al^{3+}).

B. Emulsiones de aceite

40 Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 [Capítulo 10 de la ref. 38; véase también la ref. 40] (5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80 y 0,5 % de Span 85, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). También pueden usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

45 C. Formulaciones de saponina [Capítulo 22 de la ref. 38]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

55 Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 41. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol tal como colesterol [42].

60 Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 38]. Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las ref. 42-44. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergente adicional [45].

65 Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina puede encontrarse en las ref. 46 y 47.

D. Virosomas y partículas similares a virus (VLP)

Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas virales nativos. Las proteínas virales pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas de núcleo o de cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus de Sindbis, rotavirus, virus de la glosopeda, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se tratan adicionalmente en las ref. 48-53. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, la ref. 54.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en la ref. 55. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son demasiado pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros [55]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529 [56, 57].

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las ref. 58 y 59.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar ligada por un enlace fosfato a una guanosa). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 60, 61 y 62 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo, sustitución de guanosa con 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en las ref. 63-68.

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [69]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1 tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en las ref. 70-72. Preferentemente, CpG es CpG-A ODN.

Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las ref. 69 y 73-75.

Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 76 y como adyuvantes parenterales en la ref. 77. La toxina o toxoide está preferentemente en forma de una holotoxina, que comprende tanto las subunidades A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las ref. 78-85. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en la ref. 86, que se incorpora específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [87], etc.) [88], interferones (por ejemplo, interferón-?), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [89] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención [90].

H. Micropartículas

También pueden usarse micropartículas como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30 µm de diámetro, y lo más preferentemente ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(a-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico tal como CTAB).

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 38)

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en las ref. 91-93.

J. Formulaciones de polioxietilenéteres y polioxietilenésteres

Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen polioxietilenéteres y polioxietilenésteres [94]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol [95], además de tensioactivos de polioxietilenalquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [96]. Los polioxietilenéteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las ref. 97 y 98.

L. Muramilpéptidos

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

M. Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquimod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las ref. 99 y 100.

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvantes pueden usarse en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [101]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [102]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [103]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [104]; (6) SAF, que contiene 10 % de escualano, 0,4 % de Tween 80™, 5 % de Pluronic-polímero de bloques L121, y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula. (7) El sistema de adyuvantes Ribi™ (RAS) (Ribi Immunochem) que contiene 2 % de escualano, 0,2 % de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan de agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 38.

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

Procedimientos de tratamiento

La invención también proporciona un procedimiento de fomentar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al mamífero. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos. El procedimiento puede fomentar una respuesta de refuerzo en un paciente que se ha sensibilizado contra *N. meningitidis*. Pautas de sensibilización/refuerzo subcutáneas e intranasales para VME se desvelan en la ref. 105.

El mamífero es preferentemente un ser humano. Si la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un bebé mayor o lactante) o un adolescente; si la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna prevista para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

La invención también proporciona composiciones de VME y mezclas de la invención para su uso como medicamento. El medicamento puede fomentar preferentemente una respuesta inmunitaria en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferentemente una vacuna.

La invención también proporciona el uso de composiciones de VME y mezclas de la invención en la fabricación de un medicamento para fomentar una respuesta inmunitaria en un mamífero.

Estos usos y procedimientos son preferentemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad producida por *N. meningitidis*, por ejemplo, meningitis bacteriana (o, más específicamente, meningocócica), o septicemia.

Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por *Neisseria* después de la administración de la composición de la invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar respuestas inmunitarias contra antígenos de VME después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de composiciones de la invención puede determinarse administrándolas a sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales [106]) y a continuación determinando los parámetros estándar que incluyen anticuerpos bactericidas del suero (SBA) y títulos de ELISA (GMT). Estas respuestas inmunitarias se determinarán generalmente aproximadamente 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán con valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un aumento de SBA de al menos 4 veces u 8 veces. Si se administra más de una dosis de la composición, puede hacerse más de una determinación post-administración.

Composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio para seroprotección para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Son muy conocidos antígenos con un título de anticuerpos asociado por encima del cual un huésped se considera que se ha seroconvertido contra el antígeno, y tales títulos están publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente, se seroconvierte más del 80 % de una muestra estadísticamente significativa de sujetos, más preferentemente más del 90 %, todavía más preferentemente más del 93 % y lo más preferentemente el 96-100 %.

Las composiciones de la invención se administrarán generalmente directamente a un paciente. La administración directa puede llevarse a cabo mediante inyección parenteral (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o el brazo. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es 0,5 ml.

El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede ir seguido de un programa de dosis de refuerzo. El momento adecuado entre la dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la sensibilización y el refuerzo, puede determinarse rutinariamente. La vacuna de RIVM basada en VME se probó usando un programa de 3 ó 4 dosis primarias, con vacunación a los 0, 2 y 8 o 0, 1, 2 y 8 meses. MeNZB™ se administra como tres dosis a intervalos de seis semanas.

Como se ha descrito anteriormente, la invención puede implicar la administración de vesículas de más de un serosubtipo de *N. meningitidis*, tanto por separado como en mezcla.

La invención puede usarse para provocar inmunidad sistémica y/o de la mucosa.

En general, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas bactericidas del suero de anticuerpos después de administrarse a un sujeto. Estas respuestas se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [por ejemplo, véase la nota al final 14 de la referencia 166]. La actividad bactericida del suero (SBA) mide la destrucción bacteriana mediada por el complemento, y puede ensayarse usando complemento humano o de conejo bebé. Los criterios de la OMS requieren una vacuna para inducir al menos un

aumento de 4 veces en SBA en más del 90 % de los receptores. MeNZB™ provoca un aumento de 4 veces en SBA 4-6 semanas después de la administración de la tercera dosis.

Mezclando VME para diferentes serosubtipos, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra más de un linaje hipervirulento de meningococo. En particular, pueden inducir preferentemente respuestas bactericidas contra dos o tres de los tres siguientes linajes hipervirulentos: (i) agrupación A4; (ii) complejo ET5; y (iii) linaje 3. Adicionalmente pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra uno o más de los linajes hipervirulentos subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y contra otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Esto no significa necesariamente que la composición pueda inducir anticuerpos bactericidas contra todas y cada una de las cepas de meningococo dentro de estos linajes hipervirulentos, por ejemplo, más bien, para cualquier grupo dado de cuatro de más cepas de meningococo dentro de un linaje hipervirulento particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos el 50 % (por ejemplo, el 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) del grupo. Grupos preferidos de cepas incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. El suero tiene preferentemente un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o superior, preferentemente al menos 2^{14}), por ejemplo, el suero puede destruir al menos el 50 % de las bacterias de prueba de una cepa particular cuando se diluye 1/1024, como se describe en la referencia 166.

Composiciones preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las siguientes cepas de meningococo del serogrupo B: (i) de la agrupación A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21,16) y/o cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5, cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) y/o cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o cepa BZ198 (B:NT:-). Composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas 961-5945, 44/76 y 394/98.

Las cepas 961-5945 y G2136 son ambas cepas de referencia de MLST de *Neisseria* [id. 638 y 1002 en la ref. 107]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (por ejemplo, ATCC BAA-335) y fue la cepa secuenciada en la referencia 108. La cepa 44/76 se ha usado y caracterizado ampliamente (por ejemplo, la ref. 109) y es una de las cepas de referencia de MLST de *Neisseria* [id. 237 en ref. 107; fila 32 de la Tabla 2 en la ref. 19]. La cepa 394/98 se aisló originalmente en Nueva Zelanda en 1998, y ha habido varios estudios publicados usando esta cepa (por ejemplo, las ref. 110 y 111). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia de MLST [id. 409 en la ref. 107; fila 41 de la Tabla 2 en la ref. 19].

Otros componentes antigénicos

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

- Un antígeno de sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el oligosacárido desvelado en la ref. 112 del serogrupo C o los oligosacáridos de la ref. 113. El producto VA-MENINGOC-BC™ contiene polisacárido del serogrupo C.
- Un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, ref. 114-116; cap. 22 y 23 de la ref. 123].
- Un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, 117, 118; capítulo 15 de la ref. 123].
- Un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como antígenos de superficie y/o de núcleo [por ejemplo, 118, 119; capítulo 16 de la ref. 123].
- Un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo, 120].
- Un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina Pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o los aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, las ref. 121 y 122; capítulo 21 de la ref. 123].
- Un antígeno diftérico, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 13 de la ref. 123].
- Un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 27 de la ref. 123].
- Un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, capítulo 14 de la ref. 123].
- Un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo, ref. 124].
- Un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, 125-131].
- Un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 132].
- Un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 133].
- Antígeno(s) de la poliomiелitis [por ejemplo, 134, 135; capítulo 24 de la ref. 123] tal como IPV.
- Antígeno(s) de la rabia [por ejemplo, 136], tales como virus inactivado liofilizado [por ejemplo, 137, RabAvert™].
- Antígenos del sarampión, las paperas y/o la rubeola [por ejemplo, capítulos 19, 20 y 26 de la ref. 123].
- Antígeno(s) de la gripe [por ejemplo, capítulos 17 y 18 de la ref. 123], tal como las proteínas de la superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- Un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 138].
- Un antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 139, 140].
- Un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo, 140, 141, 142].

Si se usa un antígeno de sacárido o de hidrato de carbono, está preferentemente conjugado con un vehículo con el

fin de potenciar la inmunogenicidad. Es muy conocida la conjugación de antígenos de sacárido de *H. influenzae* B, meningocócico y neumocócico.

Los antígenos de proteínas tóxicas pueden desintoxicarse si fuera necesario (por ejemplo, desintoxicación de toxina Pertussis por medios químicos y/o genéticos [122]).

Si se incluye un antígeno diftérico en la composición, también se prefiere incluir antígeno tetánico y antígenos de Pertussis. Similarmente, si se incluye un antígeno tetánico, también se prefiere incluir antígenos diftéricos y de Pertussis. Similarmente, si se incluye un antígeno de Pertussis, también se prefiere incluir antígenos diftéricos y tetánicos. Así, se prefieren combinaciones de DTP.

Los antígenos de sacárido están preferentemente en forma de conjugados. Proteínas portadoras preferidas para conjugados son toxinas bacterianas o toxoides, tales como toxoide diftérico o toxoide tetánico. El mutante CRM197 de toxina diftérica [143-145] es un vehículo particularmente preferido, ya que es un toxoide diftérico. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [146], péptidos sintéticos [147, 148], proteínas de choque térmico [149, 150], proteínas de pertussis [151, 152], citocinas [153], linfocinas [153], hormonas [153], factores de crecimiento [153], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes de linfocitos T CD4⁺ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos [154], proteína D de *H. influenzae* [155, 156], proteína de la superficie neumocócica PspA [157], neumolisina [158], proteínas de captación de hierro [159], toxina A o B de *C. difficile* [160], etc.

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

Como una alternativa a usar antígenos de proteína en la composición de la invención, puede usarse ácido nucleico que codifica el antígeno. Los componentes de proteína de las composiciones de la invención pueden así sustituirse con ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica la proteína.

Composiciones preferidas incluyen VME meningocócicas como se ha descrito anteriormente, más un sacárido capsular conjugado de uno o más (es decir, 1, 2, 3 ó 4) serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y. Si las VME son del serogrupo B, entonces este enfoque permite cubrir los siguientes serogrupos: B+A; B+C; B+W135; B+Y; B+C+W135; B+C+Y; B+W135+Y; B+A+C+W135; B+A+C+Y; B+A+W135+Y; B+C+W135+Y; y B+A+C+W135+Y. Dos combinaciones preferidas usan VME del serogrupo B más antígenos conjugados de cualquier serogrupo A+W135+Y o serogrupo A+C+W135+Y. En general, es posible cubrir los cinco serogrupos A, B, C, W135 e Y eligiendo VME para x serogrupo(s) y sacáridos conjugados para los 5-x serogrupos restantes.

También pueden añadirse antígenos de proteínas meningocócicas específicas (preferentemente del serogrupo B) para suplementar las composiciones de VME. En particular, puede añadirse un antígeno de proteína tal como se desvela en las ref. 30 y 161 a 169. Puede añadirse un número pequeño de antígenos definidos (una mezcla de 10 o menos (por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados). Polipéptidos inmunogénicos adicionales preferidos para su uso con la invención son los desvelados en la referencia 169: (1) una proteína 'NadA'; (2) una proteína '741'; (3) una proteína '936'; (4) una proteína '953'; y (5) una proteína '287'. Otros antígenos meningocócicos suplementarios posibles incluyen proteínas de unión a transferrina (por ejemplo, TbpA y TbpB) y/o Cu,Zn-superóxido dismutasa [7]. Otros antígenos meningocócicos suplementarios posibles incluyen proteínas que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEC ID N°: 650 de la ref. 161; SEC ID N°: 878 de la ref. 161; SEC ID N°: 884 de la ref. 161; SEC ID N°: 4 de la ref. 162; SEC ID N°: 598 de la ref. 163; SEC ID N°: 818 de la ref. 163; SEC ID N°: 864 de la ref. 163; SEC ID N°: 866 de la ref. 163; SEC ID N°: 1196 de la ref. 163; SEC ID N°: 1272 de la ref. 163; SEC ID N°: 1274 de la ref. 163; SEC ID N°: 1640 de la ref. 163; SEC ID N°: 1788 de la ref. 163; SEC ID N°: 2288 de la ref. 163; SEC ID N°: 2466 de la ref. 163; SEC ID N°: 2554 de la ref. 163; SEC ID N°: 2576 de la ref. 163; SEC ID N°: 2606 de la ref. 163; SEC ID N°: 2608 de la ref. 163; SEC ID N°: 2616 de la ref. 163; SEC ID N°: 2668 de la ref. 163; SEC ID N°: 2780 de la ref. 163; SEC ID N°: 2932 de la ref. 163; SEC ID N°: 2958 de la ref. 163; SEC ID N°: 2970 de la ref. 163; SEC ID N°: 2988 de la ref. 163, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50 % o más identidad (por ejemplo, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, en las que n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítopo de la secuencia relevante. Puede incluirse más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos. También pueden añadirse los antígenos meningocócicos proteína de unión a transferrina y/o proteína Hsf [170].

La suplementación de las VME por antígenos meningocócicos definidos de esta forma es particularmente útil si las VME son de un meningococo del serosubtipo P1.7b,4 o un meningococo del serosubtipo P1.7,16. Se prefiere la suplementación de una mezcla de VME de ambos de estos serosubtipos.

Serosubtipos específicos

La invención proporciona una composición que comprende VME preparadas a partir de un meningococo que tiene uno de los siguientes subtipos: P1.2; P1.2,5; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.5,c; P1.5c,10; P1.7,16; P1.7,16b; P1.7h,4; P1.9; P1.15; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.21,16; P1.22,14

El meningococo está preferentemente en el serogrupo B.

Estas VME son adecuadas para su uso con la invención, como se ha descrito anteriormente.

Pauta de administración de VME

La invención proporciona un procedimiento de administración de una vacuna de VME meningocócica a un paciente, en el que una primera dosis se administra a tiempo cero, una segunda y una tercera dosis se administran durante los dos meses siguientes, y una cuarta dosis se administra entre los 11 y 13 meses después del tiempo cero.

La invención también proporciona un procedimiento de administración de vacunas de VME meningocócicas a un paciente, en el que una primera dosis se administra a tiempo cero, una segunda y una tercera dosis se administran durante los dos meses siguientes, y una cuarta dosis se administra entre los 11 y 13 meses después del tiempo cero, y en el que (a) la primera, segunda y tercera dosis comprenden VME con el mismo serosubtipo entre sí, y (b) la cuarta dosis comprende VME con un serosubtipo diferente de las tres primeras dosis. La cuarta dosis puede contener VME solo con un serosubtipo diferente de las tres primeras dosis, o puede contener dos tipos de VME, una con un serosubtipo diferente de las tres primeras dosis y una con el mismo subtipo.

La primera, segunda y tercera dosis se administran preferentemente a intervalos entre 6 y 8 semanas. La cuarta dosis se administra preferentemente aproximadamente 1 año después del tiempo cero.

El paciente recibe preferentemente la misma cantidad de vacuna en cada una de las cuatro dosis.

Las VME son preferentemente el serosubtipo P1.7b,4 y/o P1.7,16.

La invención también proporciona un procedimiento de administración de una vacuna meningocócica a un paciente, en el que: (a) la vacuna comprende VME meningocócicas que tienen un primer serosubtipo; (b) el paciente ha recibido previamente una vacuna de VME diferente que tiene un segundo serosubtipo, administrándose la primera dosis de la vacuna de VME diferente más de 11 meses antes de este procedimiento.

La invención también el uso de VME meningocócicas que tienen un primer serosubtipo en la fabricación de un medicamento para inmunizar contra meningitis meningocócica, en el que el medicamento es para administración a un paciente que se ha pre-inmunizado con VME que tienen un segundo serosubtipo. La administración de VME también puede seguir la inmunización con una vacuna conjugada meningocócica. Así, la invención proporciona el uso de VME meningocócicas de un primer serogrupo meningocócico en la fabricación de un medicamento para inmunizar contra al menos meningitis meningocócica, en el que el medicamento es para administración a un paciente que se ha pre-inmunizado con un sacárido capsular conjugado de un segundo serosubtipo meningocócico. Similarmente, proporciona un procedimiento de administración de una vacuna meningocócica a un paciente, en el que: (a) la vacuna comprende VME meningocócicas que tienen un primer serogrupo; (b) el paciente ha recibido previamente un sacárido capsular conjugado de un segundo serogrupo meningocócico.

La pre-inmunización puede tener lugar más de 6 meses antes de administrar las VME (por ejemplo, más de 11 meses). Así, por ejemplo, un paciente puede recibir sacáridos conjugados en el tiempo cero, y a continuación VME 11 meses después.

La pre-inmunización con un sacárido meningocócico es preferentemente con al menos el serogrupo C, pero puede ser con más de un serogrupo, por ejemplo, con tanto A+C, con A+C+Y, con A+C+W135+Y, etc.

El primer serogrupo es preferentemente el serogrupo B.

Las VME pueden administrarse al mismo tiempo que los conjugados meningocócicos, es decir, el paciente está recibiendo otra dosis de conjugado meningocócico al mismo tiempo que recibe las VME.

El paciente puede o puede no haber sido pre-inmunizado con VME del primer serogrupo.

El paciente puede haber sido pre-inmunizado con un conjugado de sacárido capsular de *H. influenzae* tipo b.

El paciente puede haber sido pre-inmunizado con un toxoide diftérico y un toxoide tetánico.

General

El término “que comprende” engloba “que incluye”, además de “que consiste”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

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

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Si es necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION***Dosificación de VME - cepa única***

Se realizaron estudios de dosificación para el producto MeNZB™ en adultos sanos. Los adultos recibieron tres dosis de tanto 25 µg como 50 µg de VME, administradas a intervalos de 6 semanas a través de una aguja de 25 mm de 23 de calibre. Se observó un aumento de cuatro veces en el título de SBA contra la cepa de la vacuna, medido 4 a 6 semanas después de la tercera vacunación, en el 100 % de los pacientes que recibieron la dosis de 25 µg pero, sorprendentemente, se observó en solo el 87 % de los pacientes que recibieron la mayor dosis. La proporción de pacientes que respondieron también fue mayor a la menor dosificación después de la segunda dosis (87 % frente a 78 %). Por tanto, la menor dosis se seleccionó para uso adicional, permitiendo así que las disoluciones madre de vacuna proporcionaran la inmunización del doble de pacientes.

Dosificación de VME - múltiples cepas combinadas

Previamente se han descrito VME preparadas a partir de la cepa noruega H44/76 y administradas a pacientes humanos en ensayos clínicos de fase I, II y III. Forman la base del producto MenBvac™. Similarmente, VME preparadas a partir de la cepa de Nueva Zelanda HZ98/254 forman la base del producto MeNZB™. Se han confirmado su seguridad y eficacia.

Tanto MeNZB™ como MenBvac™ incluyen VME a una concentración de 50 µg/ml (medida como cantidad de proteína) en una dosis de 0,5 ml. Cuando se prueba una combinación de las dos VME en seres humanos, entonces, con el fin de mantener la eficacia contra los dos serosubtipos diferentes, la comparación más directa sería mantener la concentración de cada VME a 50 µg/ml. A diferencia, los inventores eligieron mantener la dosis de VME total igual que en los dos productos monovalentes (50 µg/ml) y en lugar de dividir en dos la cantidad de cada VME, es decir, usar 25 µg/ml de cada serosubtipo.

La vacuna combinada se administra a pacientes que han recibido previamente tanto MeNZB™ como MenBvac™. La combinación se administra 1 año después de la dosis inicial de las VME monovalentes.

REFERENCIAS (cuyo contenido se incorpora por este documento por referencia)

- [1] Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
- [2] de Kleijn et al. (2001) Vaccine 20:352-358.
- [3] Patentes USA 5,597,572 & 5,747,653; ver también Patente Europea 0301992.
- [4] Patente Europea 0449958 (concedida desde WO90/06696).
- [5] Patente USA 5,705,161; ver también WO94/08021.
- [6] WO01/91788.
- [7] WO00/25811.
- [8] WO01/52885.
- [9] WO98/56901.
- [10] Sacchi et al. (1998) Rev Inst Med Trop Sao Paulo 40:65-70.
- [11] WO03/105890.
- [12] WO02/09643.
- [13] Katial et al. (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
- [14] Patente USA 6,180,111.
- [15] WO01/34642.
- [16] Patente Europea 0011243.
- [17] Fredriksen et al. (1991) NIPH Ann. 14(2):67-80.
- [18] PCT/IB2004/002475
- [19] Maiden et al. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- [20] WO99/10497.
- [21] Steeghs et al. (2001) The EMBO Journal

- 20:6937-6945.
 [22] WO02/07763.
 [23] Patente Europea 0624376.
 [24] van der Ley et al. (1995) Vaccine 13:401-7.
 5 [25] WO01/09350.
 [26] WO02/09746.
 [27] WO02/062378.
 [28] WO2004/014417.
 [29] WO2004/019977.
 10 [30] WO2004/048404.
 [31] Masignani et al. (2003) J Exp Med 197:789-799.
 [32] Gennaro (2000) Remington: The Science and
 Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN:
 0683306472.
 15 [33] RIVM report 124001 004.
 [34] RIVM report 000012 003.
 [35] WO03/009869.
 [36] Almeida & Alpar (1996) J. Drug Targeting
 3:455-467.
 20 [37] Agarwal & Mishra (1999) Indian J Exp Biol
 37:6-16.
 [38] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman.
 ISBN: 030644867X. Plenum.
 [39] WO00/23105.
 25 [40] WO90/14837.
 [41] US patent 5,057,540.
 [42] WO96/33739.
 [43] EP-A-0109942.
 [44] WO96/11711.
 30 [45] WO00/07621.
 [46] Barr et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews
 32:247-271.
 [47] Sjolander et al. (1998) Advanced Drug Delivery
 Reviews 32:321-338.
 35 [48] Niikura et al. (2002) Virology 293:273-280.
 [49] Lenz et al. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
 [50] Pinto et al. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
 [51] Gerber et al. (2001) Virol 75:4752-4760.
 [52] WO03/024480
 40 [53] WO03/024481
 [54] Gluck et al. (2002) Vaccine 20:B10-B16.
 [55] EP-A-0689454.
 [56] Johnson et al. (1999) Bioorg Med Chem Lett
 9:2273-2278.
 45 [57] Evans et al. (2003) Expert Rev Vaccines
 2:219-229.
 [58] Meraldi et al. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
 [59] Pajak et al. (2003) Vaccine 21:836-842.
 [60] Kandimalla et al. (2003) Nucleic Acids Research
 50 31:2393-2400.
 [61] WO02/26757.
 [62] WO99/62923.
 [63] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
 [64] McCluskie et al. (2002) FEMS Immunology and
 55 Medical Microbiology 32:179-185.
 [65] WO98/40100.
 [66] Patentes USA 6,207,646.
 [67] Patentes USA 6,239,116.
 [68] Patentes USA 6,429,199.
 60 [69] Kandimalla et al. (2003) Biochemical Society
 Transactions 31 (part 3):654-658.
 [70] Blackwell et al. (2003) J Immunol
 170:4061-4068.
 [71] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
 65 [72] WO01/95935.
 [73] Kandimalla et al. (2003) BBRC 306:948-953.

- [74] Bhagat et al. (2003) BBRC 300:853-861.
 [75] WO03/035836.
 [76] WO95/17211.
 [77] WO98/42375.
 5 [78] Beignon et al. (2002) Infect Immun
 70:3012-3019.
 [79] Pizza et al. (2001) Vaccine 19:2534-2541.
 [80] Pizza et al. (2000) Int J Med Microbiol
 290:455-461.
 10 [81] Scharton-Kersten et al. (2000) Infect Immun
 68:5306-5313.
 [82] Ryan et al. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
 [83] Partidos et al. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
 [84] Peppoloni et al. (2003) Expert Rev Vaccines
 15 2:285-293.
 [85] Pine et al. (2002) J Control Release 85:263-270.
 [86] Domenighini et al. (1995) Mol Microbiol
 15:1165-1167.
 [87] WO99/40936.
 20 [88] WO99/44636.
 [89] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267-276.
 [90] WO99/27960.
 [91] Patentes USA 6,090,406
 [92] Patentes USA 5,916,588
 25 [93] EP-A-0626169.
 [94] WO99/52549.
 [95] WO01/21207.
 [96] WO01/21152.
 [97] Andrianov et al. (1998) Biomaterials
 30 19:109-115.
 [98] Payne et al. (1998) Adv Drug Delivery Review
 31:185-196.
 [99] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
 [100] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs
 35 4:214-218.
 [101] WO99/11241.
 [102] WO94/00153.
 [103] WO98/57659.
 [104] Patente Europea Solicitudes 0835318,
 40 0735898 and 0761231.
 [105] Bakke et al. (2001) Infect. Immun.
 69:5010-5015.
 [106] WO01/30390.
 [107] <http://neisseria.org/nml/typing/mlst/>
 45 [108] Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
 [109] Pettersson et al. (1994) Microb Pathog
 17(6):395-408.
 [110] Welsch et al. (2002) Thirteenth International
 Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute
 50 of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002.
 Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective
 serum antibodies to groups B and C Neisseria
 meningitidis strains.
 [111] Santos et al. (2002) Thirteenth International
 55 Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute
 of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002.
 Serum bactericidal responses in rhesus macaques
 immunized with novel vaccines containing recombinant
 proteins derived from the genome of N. meningitidis.
 60 [112] Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698.
 [113] WO03/007985.
 [114] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
 [115] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am
 47:269-285, v.
 65 [116] Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev
 65:187-207.

- [117] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [118] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [119] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- 5 [120] Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [121] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [122] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [123] *Vaccines* (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN
- 10 0-7216-9688-0.
- [124] WO02/079243.
- [125] WO02/02606.
- [126] Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- 15 [127] Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- [128] Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- [129] WO99/27105.
- 20 [130] WO00/27994.
- [131] WO00/37494.
- [132] WO99/28475.
- [133] Ross et al. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [134] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am*
- 25 47:287-308.
- [135] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [136] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
- [137] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan
- 30 16;47(1):12, 19.
- [138] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [139] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- [140] WO02/34771.
- 35 [141] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [142] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [143] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- 40 [144] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [145] Anderson et al. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [146] EP-A-0372501.
- [147] EP-A-0378881.
- 45 [148] EP-A-0427347.
- [149] WO93/17712
- [150] WO94/03208.
- [151] WO98/58668.
- [152] EP-A-0471177.
- 50 [153] WO91/01146
- [154] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [155] EP-A-0594610.
- [156] WO00/56360.
- 55 [157] WO02/091998.
- [158] Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [159] WO01/72337
- [160] WO00/61761.
- [161] WO99/24578.
- 60 [162] WO99/36544.
- [163] WO99/57280.
- [164] WO00/22430.
- [165] WO96/29412.
- [166] Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820.
- 65 [167] WO01/64920.
- [168] WO03/020756.

[169] WO2004/032958.

[170] WO2004/014419.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende vesículas de membrana externa (VME) de dos o más de los serogrupos A, B, C, W135 e Y de meningococo.
2. Una composición que comprende vesículas de membrana externa de un primer serosubtipo meningocócico y un segundo serosubtipo meningocócico, en la que la concentración de VME del primer serosubtipo es aproximadamente 25 µg/ml y la concentración de VME del segundo serosubtipo es aproximadamente 25 µg/ml, en la que la composición está en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml.
- 10 3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y.
- 15 4. Un procedimiento que comprende: preparar n conjuntos de VME, uno de cada uno de n serosubtipos diferentes; y combinar los n conjuntos de vesículas en un kit, en el que n es 2, 3, 4, 5 ó 6.
5. Un kit que comprende VME preparadas a partir de n serosubtipos diferentes, en el que n es 2, 3, 4, 5 ó 6.
- 20 6. El kit de la reivindicación 5, que comprende además un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y.