

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 737**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 03784152 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 1524992**

54 Título: **Composiciones de vacuna que comprenden lipooligosacáridos de inmunotipo L2 y/o L3 de Neisseria meningitidis de IgtB**

30 Prioridad:

02.08.2002 GB 0218037	02.08.2002 GB 0218036
02.08.2002 GB 0218035	02.08.2002 GB 0218051
30.08.2002 GB 0220197	30.08.2002 GB 0220199
01.11.2002 GB 0225524	01.11.2002 GB 0225531
24.12.2002 GB 0230164	24.12.2002 GB 0230168
24.12.2002 GB 0230170	05.03.2003 GB 0305028

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2015

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 537 737 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

Composiciones de vacuna que comprenden lipooligosacáridos de inmunotipo L2 y/o L3 de *Neisseria meningitidis* de IgtB

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones de vacunas de *Neisseria*, su fabricación y la utilización de dichas composiciones en medicina. Más particularmente se refiere a procedimientos para fabricar cepas meningocócicas nuevas genomanipuladas que son más adecuadas para la producción de vacunas de *Neisseria*, en particular meningocócicas, de vesículas de la membrana externa (o "bleb"). También se describen los procedimientos ventajosos y productos de vacunas a base del uso de nuevas vacunas de subunidades de LOS o de vesículas de la membrana externa meningocócica (o "bleb") que se han mostrado más seguras y más eficaces para uso en sujetos humanos.

Antecedentes de la invención

15 *Neisseria meningitidis* (meningococo) es una bacteria Gram negativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. Es una causa de enfermedades bacterianas invasivas graves tales como bacteremia y meningitis. La incidencia de enfermedad meningocócica muestra diferencias geográficas, estacionales y anuales (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (suplemento), S18–S24, 1989). La bacteria se clasifica comúnmente según el serogrupo de su polisacárido capsular.

20 La mayoría de enfermedades en los países templados se debe a cepas de serogrupo B y varía en incidencia entre 1–10/100.000/año de total de población alcanzando algunas veces valores más altos (Kaczmarek, E. B. (1977), Común. Dis. Rep. Rev. 7: R55–9, 1995; Scholten, R. J. P. M., Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. y col. Clin. Infect. Dis. 16: 237–246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., y col. Epidemiol. Infect. 105: 119–126, 1990).

25 Las enfermedades epidémicas dominadas por meningococos del serogrupo A, la mayoría en África central, algunas veces alcanzan niveles de incidencia hasta de 1000/100.000/año (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (suplemento), S18–S24, 1989). Casi todos los casos como un conjunto de enfermedad meningocócica están ocasionados por meningococos de serogrupos A, B, C, W–135 e Y y se dispone de una vacuna tetravalente de polisacáridos capsulares A, C, W–135 e Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335–339, 1982).

30 La frecuencia de infecciones de *Neisseria meningitidis* han crecido en las pasadas pocas décadas en muchos países de Europa. Esto se ha atribuido a un incremento de transmisión debido a un incremento de actividades sociales (por ejemplo, piscinas, teatros, etc.). Ya no es infrecuente aislar cepas de *Neisseria meningitidis* que son menos sensibles o resistentes a alguno de los antibióticos convencionales. Este fenómeno ha creado una necesidad médica no cubierta y demanda nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de fármacos y ensayos de diagnósticos para este organismo.

35 Las vacunas disponibles de polisacáridos se están actualmente mejorando por medio de su conjugación química a proteínas portadoras (Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K., y col. JAMA 275: 1499–1503, 1996).

40 Sin embargo, no se dispone de una vacuna de serogrupo B. El polisacárido capsular de serogrupo B se ha encontrado que es no inmunogénico muy probablemente porque comparte similar estructura con componentes de hospedador (Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L. y col. J. Infect. Dis. 126: 514–522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Mäkelä, P. M. Lancet ii.: 355–357, 1983). Por lo tanto se ha fijado el esfuerzo para tratar de desarrollar vacunas de serogrupo B de vesículas de la membrana externa (o "bleb") o componentes proteicos purificados de los mismas.

45 Los antígenos meningocócicos alternativos para el desarrollo de vacunas son lipooligosacáridos meningocócicos (LOS). Estos son glicolípidos unidos a la membrana externa que se diferencian de los lipopolisacáridos (LPS) de las Enterobacteriaceas por la carencia de las cadenas secundarias O y de este modo se parecen a la forma basta de LPS (Griffiss y col., Rev Infect Dis 1988; 10: S287–295). La heterogeneidad dentro del resto de oligosacárido de los LOS genera diversidad estructural y antigénica entre diferentes cepas meningocócicas (Griffiss y col. Inf. Immun. 1987; 55: 1792–1800). Esto se ha utilizado para subdividir las cepas en 12 inmunotipos (Scholtan y col. J Med Microbiol 1994, 41:236-243). Los inmunotipos L3, L7, L9 son inmunológicamente idénticos y son estructuralmente similares (o incluso la misma) y, por lo tanto, se han designado por lo tanto L3, 7, 9 (o para los propósitos de esta memoria descriptiva, genéricamente como "L3"). Los LOS meningocócicos L3, 7, 9 (L3), L2 y L5 se pueden modificar mediante sialilación o mediante la adición de ácido citidina 5'-monofosfato-N-acetilneuramínico. Aunque los LOS L2, L4 y L6 se pueden distinguir inmunológicamente, son estructuralmente similares y donde se menciona L2 en esta memoria descriptiva, bien L4 o L6 pueden estar opcionalmente sustituidos dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos de LOS se ha mostrado que protegen en ratas experimentales contra la infección y contribuyen a la actividad bactericida en niños infectados con *N. meningitidis* (Griffiss y col. J. Infect Dis 1984; 150: 71–79).

55 Quakyi y col. (Infect. Immun. 1997 65:1972-1979) dan a conocer cepas meningocócicas con LOS truncados.

Jennings y col. (Mol. Microbiol. 1995 18:729-740) dan a conocer un locus para la biosíntesis de la estructura de lipopolisacárido con lacto-N-neotetraosa terminal en meningocócicos.

Sin embargo, un problema asociado con el uso de LOS en una vacuna meningocócica, es su toxicidad (debida a su resto de lípido A).

- 5 Los LOS están también presentes en la superficie de vesículas de la membrana externa meningocócicas. Durante muchos años los esfuerzos se han fijado en desarrollar vacunas a base de vesículas de la membrana externa meningocócica (o vesícula de la membrana externa) (de Moraes, J. C., Perkins, B., Camargo, M. C. y col Lancet 340: 1074–1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E. A. Gronnesby, J. K. y col 338: 1093–1096, 1991). Dichas vacunas tienen la ventaja de incluir diversas proteínas de la membrana externa integrales en una conformación plegada
10 adecuadamente que puede provocar una respuesta inmunológica protectora cuando se administra a un hospedador. Además, las cepas de *Neisseria* (incluyendo *N. meningitidis* serogrupo B–menB) excretan vesículas de la membrana externa de membranas externa en cantidades suficientes para permitir su producción a escala industrial. Sin embargo, más a menudo las vesículas de la membrana externa se preparan mediante procedimientos que comprenden una extracción con 0,5 % de detergente (por ejemplo, desoxicolato) de las células bacterianas (por
15 ejemplo, el documento EP 11243). Aunque esto se desea debido a la toxicidad de LOS (también llamada endotoxina), como se ha descrito anteriormente, también tiene el efecto de eliminar la mayoría del antígeno de LOS de la vacuna..

- Un problema adicional con el uso de LOS como antígeno de vacuna es que los 12 inmunotipos de LPS existen con un intervalo diverso de estructuras de carbohidratos (M. P. Jennings y col., Microbiology 1999, 145, 3013–3021). Los
20 anticuerpos que surgen contra un inmunotipo fracasan para reconocer un inmunotipo diferente. Aunque se ha fijado el esfuerzo para producir una región “central” genérica de las porciones de oligosacárido de los inmunotipos de LOS (por ejemplo, el documento WO 94/08021), la actividad bactericida de los anticuerpos generados contra los LOS modificados se pierde. De este modo una vacuna puede necesitar tener muchos componentes de LOS de inmunotipos diferentes para ser eficaz.

- 25 Existe un problema adicional con el uso de LOS (también conocidos como LPS o lipopolisacárido) como antígenos en vacunas humanas, particularmente las que llevan estructuras de sacáridos que son similares a las estructuras de sacáridos de tipo humano (por ejemplo, en glóbulos rojos humanos), de este modo planteando una cuestión de seguridad con su uso. Todavía cambiando la estructura de LOS es problemático debido a la sensibilidad estructural de la eficacia bactericida del antígeno de LOS.

- 30 La presente invención presenta procedimientos para la mejora de uno o más de los problemas anteriores y presenta procedimientos para fabricar nuevas vacunas a base de LOS meningocócicos como un antígeno protector, en particular cuando está presente en una vesícula de membrana externa.

Descripción de la invención

- 35 La materia sujeta e información descrita en las publicaciones y patentes o solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan como referencia en esta memoria descriptiva,

La referencia a “lipooligosacárido” (o “LOS”) también se puede denominarse “lipopolisacárido” o “LPS”.

Los términos “comprendiendo”, “comprenden” y “comprende” en esta memoria descriptiva tiene la intención de los inventores de ser opcionalmente sustituibles con los términos “consistiendo en” “consisten en” y “consiste en” respectivamente en cada caso.

- 40 Los presentes inventores han encontrado que el acortamiento de las estructuras de oligosacáridos LOS conduce a la pérdida de epítomos que pueden provocar una respuesta inmune bactericida. En cambio, los inventores han encontrado que con el fin de utilizar LOS más eficazmente en una formulación de vacunas, la estructura de oligosacáridos LOS se debe conservar tanto como sea posible, pero una combinación, de justo 2 antígenos de LOS
45 puede producir una vacuna (preferiblemente meningocócica) de *Neisseria* universalmente eficaz. Un primer aspecto de la invención es una composición inmunogénica para la prevención o tratamiento de enfermedad de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica o meningocócica B) que comprende LOS (preferiblemente meningocócicos) de *Neisseria* de inmunotipo L2 y LOS de inmunotipo L3 derivados de cepas que son IgtB⁺. Los LOS se pueden aislar bien mediante procedimientos de purificación conocidos o pueden estar presentes en al menos 2 preparaciones de vesícula de membrana externa (o “bleb”) derivadas de cepas de *Neisseria* L2 y L3. Con el fin de eliminar la ligera
50 toxicidad retenida en LOS de la preparación de vesículas de la membrana externa, pero conservar altos niveles de antígeno de LOS integrado en la vesícula de la membrana externa, se prefiere que se extraigan las vesículas de la membrana externa usando una baja concentración de detergente 0–0,3 %, preferiblemente 0,05–0,2 %, más preferiblemente alrededor de 0,1 %, preferiblemente desoxicolato (o abreviadamente DOC). Dicha combinación de antígenos de LOS, particularmente en una vacuna de vesículas de la membrana externa, es sorprendentemente
55 ventajosa siendo eficaz contra más del 90 % de cepas de *N. meningitidis*.

Los inventores también han encontrado que las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa anteriores de la invención, y sin duda cualquier composición inmunogénica de vesículas de la membrana externa

derivada de *Neisseria* (preferentemente gonocócica o meningocócica) puede tener un efecto potenciado de antígenos protectores (incluyendo LOS) en su superficie si ciertas combinaciones de proteínas de membrana externa inmunodominantes se regulan hacia menores niveles de expresión (y preferiblemente suprimidas). Un aspecto de la invención es una preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* derivada de una cepa de *Neisseria* que ha tenido 2 o más de las siguientes proteínas de membrana externa reguladas hacia menores niveles de expresión y preferiblemente suprimidas, comparada con la cepa nativa no modificada: PorA, PorB, OpA, OpC o PilC. Por ejemplo, PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, o PorA y OpA y OpC se regulan hacia menores niveles o se suprimen. La regulación hacia menores niveles (preferiblemente supresión) de expresión de FrpB se ha mostrado también que es beneficiosa potenciando el efecto de antígenos de protección cruzada particularmente en preparaciones de vesículas de la membrana externa preparadas a partir de cepas de *Neisseria* desarrolladas en condiciones limitantes de hierro. Una vesícula de la membrana externa de *Neisseria* derivada de una cepa con esta mutación es de este modo una realización adicional de la invención, como son vesículas de la membrana externa derivadas de una combinación de la regulación hacia niveles menores de FrpB con una o más de las regulaciones hacia niveles menores mencionadas anteriormente. Si PorA se regula hacia niveles menores, PorB no debería regularse hacia niveles menores y viceversa.

Las mutaciones anteriores son beneficiosas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) de la que las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa van a derivar, particularmente aquellas descritas en esta memoria descriptiva, sin embargo se prefiere que se usen las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) de inmunotipo L2 o L3, extraídas típicamente con un procedimiento de extracción con bajo % de DOC, como se describe en esta memoria descriptiva. Preferiblemente las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa de la invención contienen tanto vesículas de la membrana externa L2 como L3 de IgtB⁻ donde al menos una (y preferiblemente ambas) son deficientes en las combinaciones anteriores de las proteínas de membrana externa inmunodominante (u OMP). Las técnicas para la regulación hacia niveles menores de estos genes se describen en el documento WO 01/09350. Se conocen cuatro diferentes genes Opa que existen en el genoma meningocócico (Aho y col., 1991 Mol. Microbiol. 5: 1429–37), por lo tanto cuando se dice que Opa se regula hacia niveles menores de expresión quiere decir que preferiblemente 1, 2, 3 o (preferiblemente) los 4 genes presentes en meningococos se regulan también hacia niveles menores. Dicha regulación hacia niveles menores se puede realizar genéticamente como se describe en el documento WO 01/09350 o buscando cepas naturales meningocócicas estables fácilmente encontradas que tienen nula o baja expresión de los loci Opa. Dichas cepas se pueden encontrar utilizando la técnica descrita en Poolman y col., (1985 J. Med. Micro. 19: 203–209) donde las células que son Opa tienen un fenotipo diferente a la células que expresan Opa que se pueden ver mirando la aparición de las células en placas o en un microscopio. Una vez encontrada, la cepa se puede mostrar que es establemente Opa⁻ mediante la realización de una transferencia Western en contenidos celulares después de que se realiza una fermentación para establecer la carencia de Opa.

Seguridad de las composiciones inmunogénicas de LPS anteriores

Se ha cuestionado la seguridad de los anticuerpos surgidos de LOS L3 o L2 debido a la presencia de una estructura similar al grupo de oligosacáridos de lacto-N-neotetraosa (Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-; figura 1) presentes en glicofingolípidos humanos. Incluso si un gran número de personas se ha vacunado seguramente con vacunas de vesículas extraídas con desoxicolato que contienen una cantidad residual de LOS L3 (G. Bjune y col., Lancet (1991), 338, 1093–1096; GVG. Sierra y col., NIPH ann (1991), 14, 195–210), si LOS se va a retener como un antígeno como se analiza en esta memoria descriptiva, la supresión de la parte terminal de sacarídicos LOS se ha encontrado ser ventajosa por los inventores actuales en la prevención de cualquier reacción cruzada de la respuesta inmunitaria anti-LOS con estructuras presentes en la superficie de tejidos humanos. En la presente invención, la inactivación del gen *IgtB* da como resultado una estructura intermedia de LOS en la que el residuo de galactosa terminal y el ácido siálico están ausentes (véase la figura 1 y 2, la mutación deja una estructura 4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1- en LOS L2 y L3). Dichos intermedios se podrían obtener en una cepa de LOS L3 y/o L2.

Los mutantes IgtB⁻ se han encontrado ser por los inventores el truncamiento óptimo para resolver la cuestión de seguridad mientras todavía mantienen un epítipo de oligosacárido protector de LOS que todavía puede inducir una respuesta de anticuerpo bactericida (e incluso bactericida cruzada).

Por lo tanto, las preparaciones anteriores L2 y/o L3 (si están purificadas o en una vesícula de la membrana externa aislada) de la invención o de las preparaciones de vesículas de la membrana externa meningocócicas en general (particularmente L2 y/o L3) derivan de una cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica) que se ha genomanipulado para regular hacia niveles menores permanentemente la expresión del producto génico funcional de IgtB, preferiblemente inactivando el gen, más preferiblemente suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen.

Preferiblemente las cepas de *Neisseria* de la invención son deficientes en la síntesis del polisacárido capsular.

Cuando las preparaciones de vesículas de la membrana externa anteriores de la invención se derivan de una cepa de meningococo B, se prefiere particularmente que también se elimine el polisacárido capsular (que también contiene las estructuras de sacáridos similares a las humanas). Aunque muchos genes se podrían inactivar para llevar a cabo esto, los inventores han mostrado ventajosamente que se prefiere que la cepa de producción de

vesículas de la membrana externa se genomanipule para regular hacia niveles menores permanentemente la expresión del producto génico funcional del gen *siaD* (es decir, regulando hacia niveles menores la actividad de α -2-8 polisialiltransferasa), preferiblemente inactivando el gen, más preferiblemente, suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. Dicha inactivación se describe en el documento WO 01/09350. La mutación *siaD* (también conocida como *synD*) es la más ventajosa de muchas mutaciones que pueden dar como resultado la eliminación del epítipo similar al humano del polisacárido capsular, porque es una de las únicas mutaciones que no tienen efecto en la biosíntesis de los epítipos protectores de LOS, de esta manera siendo ventajosa en un procedimiento que pretende usar finalmente LOS como antígeno protector y tiene un efecto mínimo en el desarrollo de la bacteria. Un aspecto preferido de la invención es por lo tanto una preparación inmunogénica de vesículas de la membrana externa como se ha descrito anteriormente que se deriva de una cepa mutante de meningococo B *lgtB⁻ siaD⁻*. La cepa en sí misma es un aspecto adicional de la invención.

Aunque la mutación *siaD⁻* es preferible por las razones anteriores, se pueden utilizar otras mutaciones que inactivan la síntesis de polisacárido capsular de meningococo B (o meningococos en general). De este modo la cepa de producción de vesículas de la membrana externa se puede genomanipular para permanentemente regular hacia niveles menores la expresión del producto génico funcional de uno o más de los genes siguientes: genes *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *SiaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*), preferiblemente inactivando el gen, más preferiblemente suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. La mutación *lgtB⁻* se puede combinar con una o más de estas mutaciones. Un aspecto adicional de la invención es por lo tanto una preparación inmunogénica de vesículas de la membrana externa como se ha descrito anteriormente que se deriva de dicha cepa mutante combinada de meningococo B (o meningococos en general). La cepa en sí misma es un aspecto adicional de la invención.

Se conoce en la técnica un locus de *Neisseria* que contiene varios genes *lgt*, incluyendo *lgtB* y *lgtE* y su secuencia (véase M. P. Jennings y col., *Microbiology* 1999, 145, 3013–3021 y las referencias citadas en esta memoria descriptiva y *J. Exp. Med.* 180: 2181–2190 [1994]; documento WO 96/10086).

Las mutaciones anteriores son beneficiosas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente *menB*) de la que las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa van a derivar, particularmente aquellas descritas en esta memoria descriptiva, sin embargo, es un aspecto de la invención que se usen las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente *menB*) de inmunotipo L2 o L3, extraídas típicamente con un procedimiento de extracción con bajo % de DOC, como se describe en esta memoria descriptiva. En una realización, las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa de la invención contienen tanto vesículas de la membrana externa L2 como L3 donde al menos una (y preferiblemente ambas) deriva de cepas deficientes en la expresión de los genes anteriores.

La toxicidad de LOS

Los LOS anteriormente purificados o composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa de la invención también se pueden hacer menos tóxicas mediante la regulación hacia niveles menores de expresión de ciertos genes en la cepa de producción bacteriana de la que se derivan. Aunque dicha detoxificación puede ser no necesaria para inmunización intranasal con OMV de tipo nativo (J. J. Dabrick y col., *Vaccine* (2000), 18, 160–172), presentaría una ventaja para la detoxificación de la vacunación parenteral. Preferiblemente los LOS, LOS purificados o composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa de la invención se detoxifican genéticamente mediante ingeniería genética de la cepa de producción de *Neisseria* mediante mutación/modificación/inactivación de los genes implicados en la biosíntesis de LípidoA, particularmente los genes implicados en la adición de las cadenas de acilo secundarias al lípidoA, en particular mediante la regulación hacia niveles menores de la expresión del producto génico funcional de los genes *msbB* y/o *htrB* y preferiblemente mediante la inactivación del gen, más preferiblemente mediante la supresión de todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. Alternativamente (o además) los LOS purificado o las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa se pueden derivar de una cepa de *Neisseria* que se ha modificado genéticamente de manera que uno o más de los siguientes genes se regulan hacia niveles mayores (mediante la introducción de un promotor más fuerte o integrando una copia extra del gen): *pmrA*, *pmrB*, *pmrE* y *pmrF*. Alternativamente (o además) los LOS purificados o las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa se pueden detoxificar mediante la adición de equivalentes funcionales peptídicos no tóxicos de polimixina B [una molécula con alta afinidad para LípidoA] a las composiciones.

Véase el documento WO 01/09350 para más detalle sobre los procedimientos de detoxificación anteriores y para las secuencias de promotor/génicas relevantes y los procedimientos de regulación hacia niveles mayores y regulación hacia niveles menores. Los genes *msbB* y *htrB* de *Neisseria* se llaman también *lpxL1* y *lpxL2*, respectivamente (véase el documento WO 00/026384) y las mutaciones de supresión de estos genes se caracterizan fenotípicamente por el mutante de LOS *msbB⁻* que pierde una cadena acilo secundaria comparado con el tipo silvestre (y que mantiene la cadena acilo primaria 4 y secundaria 1), y el mutante de LOS *thrB⁻* que pierde ambas cadenas de acilo secundarias. Dichas mutaciones se combinan preferiblemente con mutaciones para asegurar que la cepa de producción es deficiente en polisacárido capsular (véase más arriba) para asegurar la presentación óptima de LOS detoxificados en la vesícula de la membrana externa o para ayudar la purificación del LOS de subunidad detoxificada. Véanse los documentos WO 93/14115, WO 95/03327, Velucchi y col., (1997) *J. Endotoxin Res.* 4: 1–12

y el documento EP 976402 para detalles adicionales de equivalentes funcionales de péptidos no tóxicos de polimixina B que se pueden utilizar en las composiciones de esta invención—particularmente el uso del péptido SAEP 2 (de secuencia KTKCKFLKKC donde las dos cisteínas forman un puente disulfuro).

5 Por “regulación hacia niveles menores de la expresión del producto génico funcional” se entiende en esta memoria descriptiva que las adiciones, supresiones o sustituciones se realizan al promotor o la fase de lectura abierta del gen en cuestión de manera que la actividad biosintética del producto génico total se reduce (en un 60, 70, 80, 90, 95 o más preferiblemente un 100 %). Evidentemente se pueden introducir mutaciones de desplazamiento de fase, o sustituirse promotores más débiles, sin embargo más preferiblemente la mayoría o toda la fase de lectura abierta y/o promotor se suprime para asegurar una regulación hacia niveles menores permanente del producto génico (activo) 10 (como se describe en el documento WO 01/09350).

Las mutaciones anteriores son beneficiosas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) de la que las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa van a derivar, particularmente aquellas descritas en esta memoria descriptiva, sin embargo, es un aspecto de la invención que se usen las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) de inmunotipo L2 15 o L3, extraídas típicamente con un procedimiento de extracción con bajo % de DOC, como se describe en esta memoria descriptiva. Preferiblemente las composiciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa de la invención contienen tanto vesículas de la membrana externa L2 como L3 donde al menos una (y preferiblemente ambas) deriva de cepas deficientes en la expresión de los genes anteriores.

Los aspectos adicionales de la invención incluyen las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica o gonocócica o meningocócica B) modificadas genéticamente descritas anteriormente de las que los LOS o preparaciones inmunogénicas de vesículas de la membrana externa de la invención se pueden derivar. 20

Las preparaciones de LOS o de vesículas de la membrana externa que contienen LOS de la invención

Un aspecto adicional de la invención son las preparaciones de LOS (particularmente cualquiera de las descritas anteriormente) aisladas de las cepas de *Neisseria* de la invención. El LOS aislado (o vesícula de la membrana externa que contiene LOS) es inmunotipo L2 o L3 y preferiblemente las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden ambas preparaciones de LOS (o vesícula de la membrana externa) L2 y L3 de la invención. 25

Dichas preparaciones también se pueden mejorar mediante la conjugación de la porción de oligosacárido de los LOS anteriores (si está purificada o presente en una preparación de vesículas de la membrana externa) a un portador que comprende una fuente de epítomos de células T (de este modo obteniendo los LOS e incluso mejor un inmunógeno [T dependiente]). Una preparación de LOS purificada de la invención puede producir alternativamente 30 (o además) un antígeno mejor presentándolo en formulaciones de liposomas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 96/40063 y las referencias citadas en esta memoria descriptiva).

El procedimiento de aislamiento de LOS a partir de bacterias se conoce bien en la técnica (véase por ejemplo, el procedimiento de agua-fenol en caliente de Wesphal y Jann [Meth. Carbo. Chem. 1965, 5:83-91]). Véase también Galanos y col., 1969, Eur J. Biochem 9: 245–249, y Wu y col., 1987 Anal Bio Chem 160: 281–289. Se conocen también las técnicas para conjugar LOS aislado (véase, por ejemplo, el documento EP 941738). 35

Para los propósitos de esta invención “un portador que comprende una fuente de epítomos de células T” es usualmente un péptido o, preferiblemente, un polipéptido o proteína. Las técnicas de conjugación se conocen bien en la técnica. Los portadores típicos incluyen proteína D de *H. influenzae* no caracterizable, toxoide de tétanos, toxoide de difteria y CRM197, o proteínas de membrana externa presentes en preparaciones de vesículas de la membrana externa (particularmente de *Neisseria* o meningocócicas). 40

Las composiciones de LOS aisladas preferidas de la invención son: una composición que comprende LOS L2 y L3 que tiene una estructura consistente con la que se ha derivado de una cepa meningocócica lgtB⁻ en la que la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un portador que comprende una fuente de epítomos de células T y más preferiblemente una composición que comprende LOS L2 y L3 aislados que tienen una estructura consistente con ellos que se han derivado de una cepa meningocócica lgtB⁻ en las que la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un portador que comprende una fuente de epítomos de células T. 45

Preferiblemente las composiciones de LOS de la invención se han detoxificado. Esto se puede hacer mediante técnicas conocidas de tratamientos químicos de hidracina o hidrólisis alcalina que retiran las cadenas de acilo de la molécula (pero que pueden reducir la eficacia protectora de la molécula), pero se realiza preferiblemente mediante el aislamiento de LOS de un mutante meningocócico htrB⁻ o mshB⁻ (como se ha descrito anteriormente; particularmente en cepas de menos polisacáridos de las cápsulas), o mediante la adición de un equivalente funcional peptídico no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad a Lípido A] a la composición, en particular SAEP 2 (como se ha descrito anteriormente). 50

Los LOS de la invención se pueden administrar en un estado aislado (usualmente en forma de micelas si el resto de lípido A está todavía intacto) o se pueden administrar en un liposoma. En tal caso las proteínas de membrana externa se pueden añadir al liposoma y los LOS se pueden conjugar intra-liposoma a dichas proteínas de membrana 55

externa para obtener el oligosacárido un antígeno T dependiente. Esto se puede realizar con una química similar a la descrita para la reticulación de LOS intra-vesículas de la membrana externa como se describe más adelante.

Reticulación (conjugación) intra-vesícula de la membrana externa de la porción de oligosacárido de LOS a las proteínas de membrana externa presentes en la superficie de la vesícula de la membrana externa

5 Cuando LOS de la invención está presente en una formulación de vesícula de la membrana externa el LOS se
 10 conjuga preferiblemente *in situ* mediante procedimientos que permiten la conjugación de LOS a una o más proteínas de membrana externa también presentes en la preparación de las vesículas de la membrana externa (por ejemplo, PorA o PorB en meningococo). Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención es una preparación de vesículas de la membrana externa de una cepa de bacterias Gram negativas en la membrana externa de la que se integra una proteína de membrana externa conjugada al LOS de la invención. Aunque el LOS de la invención se puede añadir a una preparación de vesículas de la membrana externa para la conjugación, es preferible que el LOS esté presente de forma natural en la superficie de la preparación de vesículas de la membrana externa.

15 Este procedimiento puede potenciar ventajosamente la estabilidad y/o inmunogenicidad (que proporciona colaboración decélulas T) y/o antigenicidad del antígeno LOS dentro de la formulación de vesículas de la membrana externa -proporcionando de esta manera colaboración de células T para el inmunógeno de oligosacárido T-independiente en su conformación más protectora - como LOS en su ambiente natural en la superficie de membrana externa meningocócica. Además, la conjugación de los LOS dentro de la vesícula de la membrana externa puede dar como resultado una detoxificación de los LOS (sin pretender establecer un vínculo teórico, la porción de lípido A puede estar más establemente enterrada en la membrana externa y, de esta manera, estando menos disponible para ocasionar toxicidad). De este modo los procedimientos de detoxificación mencionados anteriormente de aislamiento de vesículas de la membrana externa a partir de mutantes htrB⁻ o msbB⁻ o mediante la adición de equivalente funcional peptídico no tóxico de polimixina B a la composición pueden no requerirse (pero que se pueden añadir en combinación para la seguridad adicional).

20 Las preparaciones de vesículas de la membrana externa conjugadas de la invención son típicamente tales que la toxicidad de los LOS en la vesícula de la membrana externa está reducida en comparación con las mismas vesículas de la membrana externa con la misma cantidad de LOS totalmente no conjugados. La toxicidad de LOS se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, usando el ensayo de pirogenicidad en conejos para LOS en la Farmacopea Europea. (véase el ejemplo 7)

25 Las preparaciones de vesículas de la membrana externa conjugadas de la invención son ventajosamente tales que el LOS conjugado tiene una conformación adecuada para provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador, cuyos suero es reactivo (se puede unir) con LOS no conjugados -preferentemente presentes en la bacteria a partir de la que se hizo la preparación de vesículas de la membrana externa, y más preferiblemente, de una manera bactericida en un ensayo SBA-.

30 Si las vesículas de la membrana externa de *Neisseria* se conjugan a LOS, y las vesículas de la membrana externa se derivan de una cepa que se regula hacia niveles menores en una o más proteínas de membrana externa inmunodominantes, como se describe en esta memoria descriptiva, se prefiere que si PorA se regula hacia niveles menores, PorB no debería regularse hacia niveles menores y viceversa. Esto permite a la mayoría de LOS reticularse con una proteína de membrana externa mayor, y, de este modo, se minimiza cualquier efecto de conjugación en antígenos de membrana externa de protección cruzada menores en la vesícula de la membrana externa.

35 En particular, los inventores han encontrado que una composición que comprende vesículas de la membrana externa en la que LOS presente en las vesículas de la membrana externa se ha conjugado con una forma intra-vesícula de la membrana externa a las proteínas de membrana externa también presentes en la vesícula de la membrana externa puede formar la base de una vacuna para el tratamiento o prevención de enfermedades ocasionadas por el organismo a partir del cual se han derivado las vesículas de la membrana externa, siendo dicha vacuna de toxicidad reducida (preferiblemente sustancialmente no tóxica) y es capaz de inducir una respuesta bactericida T dependiente contra LOS en su ambiente nativo.

40 Por lo tanto esta invención proporciona además dicha preparación de vesículas de la membrana externa conjugadas a LOS intra-vesícula de la membrana externa (de la invención). Por "intra vesícula de la membrana externa" se entiende que el LOS de la invención presente de forma natural en la vesícula de la membrana externa se conjuga con una proteína de membrana externa presente en la misma vesícula de la membrana externa.

45 Dichas preparaciones de vesículas de la membrana externa se pueden aislar a partir de la bacteria en cuestión (véase el documento WO 01/09350) y después se someten a procedimientos químicos de conjugación conocidos a grupos de unión (por ejemplo, NH₂ o COOH) en la porción de oligosacárido de LOS a grupos (por ejemplo, NH₂ o COOH) en las proteínas de membrana externa de la vesícula de la membrana externa. Se pueden usar las técnicas de reticulación que utilizan glutaraldehído, formaldehído o mezclas de glutaraldehído/formaldehído, pero se prefiere que se usen técnicas químicas más selectivas tales como EDAC o EDAC/NHS (J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hidroxisuccinimide of water soluble carbodiimide-mediated coupling reactions.

Analytical chemistry 156: 220–222 (1986); y Bioconjugates Techniques : GregT. Hermanson (1996) pp. 173–176). Otras técnicas químicas de conjugación o tratamientos capaces de crear enlaces covalentes entre LOS y moléculas de proteínas que se podrían usar se describen en el documento EP 941738.

5 Preferiblemente las preparaciones de vesículas de la membrana externa se conjugan en ausencia de polisacárido capsular. Las vesículas de la membrana externa se pueden aislar a partir de una cepa que no produce polisacárido capsular (naturalmente o mediante mutación), o se pueden purificar a partir de la mayoría (más del 60, 70, 80, 90 o 99 % eliminado) y preferiblemente todos los polisacáridos capsulares contaminantes. De esta forma, la reacción de conjugación de LOS intra-vesícula de la membrana externa es mucho más eficaz.

10 Preferiblemente más del 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 95 % de los LOS presentes en las vesículas de la membrana externa está reticulado/conjugado.

15 Preferiblemente las vesículas de la membrana externa de la invención se han preparado del tal modo que el contenido de LOS de las vesículas de la membrana externa de 3-30, 5-25, 10-25, 15-22, y más preferiblemente alrededor de o aproximadamente el 20 % del contenido de LOS medido con tinción con plata después de la electroforesis de SDS-PAGE usando LOS purificado como un patrón (véase procedimiento de Tsai, J. Biol. Standardization (1986) 14:25-33). Se puede conseguir el 20 % de LOS en vesículas de la membrana externa meningocócicas con extracción con bajo DOC al 0,1 %, que puede eliminar ligeramente las moléculas de LOS retenidas, pero conservar la mayoría del antígeno.

20 Si las vesículas de la membrana externa conjugadas intra-vesícula de la membrana externa se derivan de meningococo, se prefiere que la cepa a partir de la cual se derivan sea una cepa de mutantes que no puede producir polisacárido capsular (por ejemplo, una de las cepas de mutantes descritas anteriormente, en particular siaD⁻). También se prefiere que las composiciones inmunogénicas eficaces contra la enfermedad meningocócica comprendan tanto una vesícula de la membrana externa L2 como L3, en las que LOS L2 y L3 se conjugan ambos con las proteínas de membrana externa de las vesículas de la membrana externa. Además, la estructura LOS dentro de la vesícula de la membrana externa conjugada intra-vesícula de la membrana externa es consistente con la que se ha derivado de una cepa meningocócica lgtB⁻. Las composiciones inmunogénicas comprenden vesículas de la membrana externa conjugadas intra-vesícula de la membrana externa: derivadas de una cepa meningocócica mutante L2 o L3 que no puede producir polisacárido capsular y es lgtB⁻; comprendiendo vesículas de la membrana externa de L2 y L3 derivadas de cepas meningocócicas mutantes que son lgtB⁻ o comprendiendo vesículas de la membrana externa de L2 y L3 derivadas de cepas meningocócicas mutantes que no pueden producir polisacárido capsular y son lgtB⁻.

30 Una típica cepa meningocócica L3 que se puede usar en la presente invención es la cepa H44/76 menB. Una cepa típica de L2 es la B16B16 menB o la cepa meningocócica 39E tipo C o la cepa 760676.

35 Como se ha indicado anteriormente las vesículas de la membrana externa de la invención se han detoxificado a un grado mediante el acto de conjugación y no necesitan detoxificarse posteriormente, sin embargo, para seguridad adicional se puede utilizar procedimientos adicionales de detoxificación, por ejemplo, usando vesículas de la membrana externa derivadas de una cepa meningocócica que es htrB⁻ o msbB⁻ o añadiendo un equivalente péptido funcional no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad a Lípido A] (preferiblemente SEAP 2) a la composición de vesículas de la membrana externa (como se ha descrito anteriormente). La conjugación de LOS (particularmente en una manera intra-vesícula de la membrana externa) muestra de este modo sorprendentemente una menor toxicidad de LOS comparada con las preparaciones que comprenden la misma cantidad de LOS no conjugado. De este modo un procedimiento general para detoxificar vesículas de la membrana externa (particularmente meningocócicas) se da a conocer adicionalmente por medios de conjugación intra-vesícula de la membrana externa de LOS a la proteína de membrana externa de las vesículas de la membrana externa.

45 En la anterior forma se proporcionan las vesículas de la membrana externa meningocócicas y composiciones inmunogénicas que comprenden vesículas de la membrana externa que tienen como un LOS de antígeno importante que es reducido en toxicidad (y preferiblemente sustancialmente no tóxico), desprovisto de problemas de autoinmunidad, tiene un carácter T-dependiente, está presente en su ambiente natural y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo bactericida potencialmente contra más del 90 % de cepas meningocócicas (en el caso de composiciones de L2 + L3).

50 Uno o más de polisacáridos capsulares de Men A, C, Y o W u oligosacáridos (preferiblemente al menos MenC, o MenA y MenC, o Men C y MenY) se pueden también conjugar en una proteína de membrana externa de la vesícula de la membrana externa de la invención también. Aunque esto se podría hacer en la misma reacción como reticulación de LOS, se prefiere que se haga en una reacción separada (preferiblemente más tarde).

55 El procedimiento de conjugación de LOS intra-vesícula de la membrana externa óptimo es un aspecto adicional de la presente invención. Dicho procedimiento debería incorporar las etapas de aislar las vesículas de la membrana externa de la invención (preferiblemente) usando un bajo % de DOC como se describe en esta memoria descriptiva), llevar a cabo un tratamiento químico adecuado para conjugar LOS de la invención (preferiblemente a través de su resto de oligosacárido) presentes en las vesículas de la membrana externa con una proteína de membrana externa

presente en la misma vesícula de la membrana externa, aislar la preparación de vesículas de la membrana externa conjugadas intra-vesícula de la membrana externa y opcionalmente formular la preparación de vesículas de la membrana externa conjugadas intra-vesícula de la membrana externa con una preparación de vesículas de la membrana externa conjugadas intra-vesícula de la membrana externa adicional hecha mediante el mismo procedimiento, pero que tiene un inmunotipo LOS diferente (preferiblemente mezclando vesículas de la membrana externa de *Neisseria/meningococo* L2 y L3) y/o formular la preparación de vesículas de la membrana externa con un excipiente farmacéuticamente aceptable para hacer una composición de vacuna.

La conjugación intra-vesícula de la membrana externa debe incorporar 1, 2 o las 3 de las siguientes etapas de procedimiento: el pH de la conjugación debe ser mayor pH 7,0, preferiblemente mayor o igual que pH 7,5 (más preferiblemente inferior a pH 9); condiciones de 1–5 % preferiblemente 2–4 % más preferiblemente alrededor de 3 % de sacarosa se debe mantener durante la reacción; NaCl se debe minimizar en la reacción de conjugación, preferiblemente por debajo de 0,1 M, 0,05 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,001 M y más preferiblemente no presente en absoluto. Todas estas características del procedimiento aseguran que las vesículas de la membrana externa permanezcan estables y en solución durante todo el procedimiento de conjugación.

El procedimiento de conjugación EDAC/NHS es un procedimiento preferido para la conjugación intra-vesícula de la membrana externa. EDAC/NHS se prefiere a formaldehído que puede reticular a demasiada altura una extensión de este modo afectando adversamente a la filtrabilidad. EDAC reacciona con ácidos carboxílicos (tales como KDO en LOS) para crear un intermedio éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina (tales como lisinas en proteínas de membrana externa, tales como PorB), se forma un enlace de amida con liberación de un subproducto de isourea. Sin embargo, la eficacia de una reacción mediada por EDAC se puede incrementar mediante la formación de un intermedio de éster Sulfo-NHS. El éster Sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más tiempo que el éster activo formado a partir de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De este modo rendimientos más altos de la formación de enlace de amida se pueden realizar usando este procedimiento en dos etapas. La conjugación de EDAC/NHS se describe en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodimida-mediated coupling reactions. *Analytical chemistry* 156: 220–222 (1986); y *Bioconjugates Techniques*. Greg T. Hermanson (1996) pp 173–176. Preferiblemente se usa en la reacción 0,01–5 mg de EDAC por mg de vesícula de la membrana externa, preferiblemente 0,05–1 mg de EDAC por mg de vesícula de la membrana externa. La cantidad de EDAC usada depende de la cantidad de LOS presente en la muestra que a su vez depende del % de deoxicolato (DOC) usado para extraer las vesículas de la membrana externa. A bajo % de DOC (por ejemplo, 0,1 %), se usan altas cantidades de EDAC (1 mg/g y más), sin embargo a alto % de DOC (por ejemplo, 0,5 %), se utilizan menos cantidades de EDAC (0,025–0,1 mg/mg) para evitar demasiada reticulación inter-vesículas de la membrana externa.

Por lo tanto, un procedimiento preferido de la invención es un procedimiento para producir LOS conjugado a intra-vesícula de la membrana externa de la invención (preferiblemente meningocócico) que comprende las etapas conjugar vesículas de la membrana externa en presencia de EDAC/NHS a un pH entre 7,0 y pH 9,0 (preferiblemente alrededor de pH 7,5) en 1–5 % (preferiblemente alrededor del 3 %) de sacarosa y opcionalmente en condiciones sustancialmente desprovistas de NaCl (como se ha descrito anteriormente) y aislar las vesículas de la membrana externa conjugadas de la mezcla de reacción.

A la reacción puede seguir geles de separación de Western de la mezcla de reacción usando anti-LOS (por ejemplo, anti-L2 o anti L3) mAbs para mostrar el incremento de peso molecular de LOS para una mayor proporción de LOS en las vesículas de la membrana externa a medida que transcurre el tiempo de reacción.

Se pueden recuperar rendimientos del 99 % de vesículas de la membrana externa usando dichas técnicas.

Se encontró que EDAC es un agente de reticulación intra-vesículas de la membrana externa excelente porque reticuló LOS a OMP suficientemente para mejorar la inmunogenicidad T-dependiente de LOS, pero no lo reticuló a tal alto grado que se produjeron los problemas tales como escasa filtrabilidad, agregación y reticulación intra-vesícula de la membrana externa. La morfología de las vesículas de la membrana externa generadas es similar a la de las vesículas de la membrana externa no conjugadas (microscopio electrónico). Además, el protocolo anterior evitó que tuviese lugar una reticulación demasiado alta (que puede disminuir la inmunogenicidad de las OMP protectoras presentes naturalmente en la superficie de la vesícula de la membrana externa, por ejemplo TbpA o Hsf).

Técnicas para aislar vesículas de la membrana externa

Las vesículas de membrana externa (abreviadamente OMV o "blebs") se pueden aislar mediante muchas técnicas conocidas (Frediksen y col., *NIPH Annals* (1991), 14, 67–79; Zollinger y col., *J. Clin Invest* (1979), 63, 836–848; Saunders y col., *Infect Immun* (1999), 67, 113–119; J. J. Drabick y col., *Vaccine* (1999), 18, 160–172). Estos se dividen en dos grupos principales de técnicas que usan desoxicolato (alrededor de 0,5 %) para extraer vesículas de la membrana externa de meningococo y técnicas que usan bajos niveles de desoxicolato (abreviadamente DOC) o nada de desoxicolato en absoluto. Las vesículas de la membrana externa de procedimiento libre de DOC tienen la característica interesante de mantener alto nivel de LOS en las OMV que es ventajoso en una vacuna donde LOS es un antígeno protector. Comparadas con las vesículas de la membrana externa extraídas con DOC la concentración

de L3 Ags en OMV obtenida mediante un procedimiento exento de DOC es aproximadamente diez veces más alta. Por esta razón se prefiere un procedimiento exento de detergente (preferiblemente exento de DOC) de preparación de vesículas de la membrana externa para los propósitos de los procedimientos de esta invención, aunque la extracción con un tampón que contiene bajos niveles de detergente (preferiblemente DOC) puede también ser ventajosa en que la etapa dejaría la mayoría de LOS que interacciona estrechamente en la vesícula de la membrana externa mientras que elimina cualquier LOS más tóxico ligeramente retenido. Típicamente 0–0,5 % y preferiblemente 0,02–0,4 %, 0,04 3 % o 0,06–2 % de detergente (preferiblemente DOC) se utiliza para la extracción de vesículas de la membrana externa, más preferiblemente 0,08–0,15 % y más preferiblemente alrededor de o exactamente 0,1 % se utiliza para obtener una cantidad óptima de LOS para estar establemente presente en las vesículas de la membrana externa. Los procedimientos de extracción exentos de DOC (o bajos en DOC – 0,3 % o por debajo) se prefieren particularmente cuando los LOS se han detoxificado mediante uno o más de los procedimientos detallados anteriormente.

Se prefiere que el contenido de LOS de las vesículas de la membrana externa en todas las realizaciones de la presente invención sea de 3-30, 5-25, 10-25, 15-22, y más preferentemente aproximada o exactamente del 20 % del contenido de LOS medido mediante tinción con plata después de electroforesis de SDS-PAGE utilizando LOS purificado como patrón (véase procedimiento Tsai, J. Biol. Standardization (1986) 14: 25–33). Usando LOS L3 Nmen como patrón en este procedimiento, en general el contenido de LOS en vesículas de la membrana externa de inmunotipo L3 Nmen extraídas con 0,1% de DOC es de aproximadamente el 20 % de LOS, con 0,2 % de DOC es de aproximadamente el 15 % de LOS, con 0,3 % de DOC es de aproximadamente el 10 % de LOS y con 0,5 % de DOC es de aproximadamente el 5 % de LOS.

Composiciones de vacunas

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden formular fácilmente en forma de composiciones de vacunas mediante la adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un procedimiento para fabricar las composiciones inmunogénicas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica) o vacunas de la invención se proporciona adicionalmente comprendiendo las etapas de aislar LOS purificados de la invención (L2 o L3) como se ha descrito anteriormente o producir vesículas de la membrana externa aisladas de la invención (con un inmunotipo L2 o L3) como se ha descrito anteriormente y formular los LOS o vesículas de la membrana externa con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente LOS purificados o ambos inmunotipos L2 y L3 de la invención, o vesículas de la membrana externa de ambos inmunotipos L2 y L3 de la invención, o un LOS purificado de L2 y una vesícula de la membrana externa de L3 (o viceversa), se combinan en una etapa de mezcla. Preferiblemente los LOS purificados o vesícula de la membrana externa de la invención se han conjugado como se ha descrito anteriormente después del aislamiento. También se puede añadir una etapa adicional de formulación de liposomas para los LOS purificados (usando técnicas conocidas en la técnica, véase por ejemplo el documento WO 96/40063 y referencias citadas en esta memoria descriptiva). Preferiblemente las preparaciones de vesículas de la membrana externa se aíslan mediante extracción con concentraciones bajas (o sin) de DOC (como se ha descrito anteriormente).

Dichos procedimientos de combinación de L2 y L3 pueden producir una vacuna que es eficaz contra casi todas las cepas de meningococos B.

Las composiciones inmunogénicas anteriores (o procedimientos) pueden tener añadidos uno o más (2, 3 o 4) polisacáridos u oligosacáridos meningocócicos (bien puros o conjugados a un portador que comprende epítomos de células T, como se ha descrito anteriormente) de serogrupos A, C, Y o W a la composición. Preferiblemente al menos se añade C (más preferiblemente conjugado) y más preferiblemente A y C o Y y C (preferiblemente todos conjugados) y más preferiblemente A, C, o Y y W (preferiblemente todos conjugados). Ventajosamente un polisacárido u oligosacárido capsular B de *H. influenzae* también se incluye en las composiciones anteriores para generar una vacuna de meningitis universal.

Preferiblemente las composiciones que consisten en o que comprenden composiciones específicamente individualizadas en el documento WO 94/08021 no se reivindican en la presente invención.

Formulaciones de vacunas de la invención

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden formular con un adyuvante adecuado para generar composiciones de vacunas de la invención.

Los adyuvantes adecuados comprenden una sal de aluminio tal como gel hidróxido de aluminio (abreviadamente alumbre) o fosfato de aluminio (preferiblemente hidróxido de aluminio), pero también puede ser una sal de calcio (particularmente carbonato cálcico), hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente, o polifosfatos.

Los sistemas adyuvantes adecuados de Th1 que se pueden añadir incluyen lípido A monofosforilo, particularmente lípido A monofosforilo de 3-de-O-acilado (u otros derivados de LPS no tóxicos) y una combinación de lípido A monofosforilo, preferiblemente lípido A monofosforilo de 3-de-O-acilado (abreviadamente 3D-MPL) [o derivados de

LPS no tóxicos] junto con una sal de aluminio (preferiblemente fosfato de aluminio). Un sistema potenciado implica la combinación de un lípido A monofosforilo y un derivado de saponina particularmente la combinación de QS21 [u otra saponina] y 3D-MPL [o un derivado de LPS no tóxico] como se describe en el documento WO 94/00153 o una composición menos reactogénica donde la QS21 [o saponina] se inactiva con colesterol como se describe en el documento WO96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO95/17210 y es una formulación preferida que también puede añadirse. Otros adyuvantes que también se pueden añadir comprenden una saponina, más preferiblemente QS21 y/o una emulsión de aceite en agua y tocoferol. También se puede añadir oligonucleótidos que contienen CpG sin metilar (documento WO 96/02555).

La preparación de vacunas se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach") (eds Powell M. F. y Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York.

Una dosis inmunoprotectora de vacunas se puede administrar mediante la vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir las vías de inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante la administración a la mucosa a los tractos oral/alimentario (preferiblemente administración intranasal), respiratoria, genitourinaria. Típicamente la cantidad de vesícula de la membrana externa en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del tipo de inmunógeno específico utilizado y como se presenta. Generalmente se espera que cada dosis comprenderá 1–100 µg de cada vesícula de la membrana externa, preferiblemente 5–50 µg y más típicamente en el intervalo 5–25 µg.

Mejoras adicionales a las composiciones inmunogénicas de las vesículas de la membrana externa de la invención

Las composiciones de vesículas de la membrana externa anteriores de la invención se pueden mejorar adicionalmente en eficacia en vacunas de la invención si la cepa de *Neisseria* de las que se derivan (incluyendo gonococos y preferiblemente meningococos, más preferiblemente *N. meningitidis B*) tienen uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) regulados hacia niveles mayores mediante la inserción de copias adicionales del gen en el genoma, o introduciendo un promotor más fuerte hacia arriba del gen existente, o cualquiera de las otras formas descritas en el documento WO 01/09350 que son capaces de inducir cepas modificadas para fabricar sobre 1,2, 1,5, 2, 3, 5 o 10 veces el nivel de antígeno comparado con la cepa no modificada: NspA (documento WO 96/29412), Hsf o truncados de los mismos (documentos WO 99/31132 y WO 01/55182; también conocido como NhhA), Hap (documento PCT/E99/02766) OMP85 (documento WO 00/23595, PilQ (documento PCT/E99/03603), PldA (documento PCT/EP99/03603), FrpB (documento WO 96/31618), TbpA (documentos WO92/03467, US59112336, WO93/06861 y EP586266), TbpB (documentos WO93/06861 y EP586266), NadA (Comanducci y col., J. Exp. Med 2002 195: 1445–1454), FrpA/FrpC o porciones en común entre estos antígenos que implican 5 o más secuencias repetidas (documento WO 92/01460; Thompson y col., (1993) J. Bacteriol. 175: 811–818; Thompson (1993) Infect. Immun. 61: 2906–2911), LbpA, LbpB (documento PCT/EP98/05117), FhaB (documento WO98/02547 SEC ID N° 38 [nucleótidos 3083-9025]), HasR (documento PCT/EP99/05989), lipo02 (documento PCT/EP99/08315), Tbp2 (documento WO 99/57280; NMB 0460), MltA (documento WO 99/57280; NMB 0033), TspA (documento WO 00/03003), TspB (documento WO 00/03003) y ctrA (documento PCT/EP00/00135), MafB (NMB 0652), MafB (NMB0643), Adhesin X (NMB 0315), Adhesin Y (NMB 0995), Adhesin Z (NMB 1119), y OstA (NMB 0280). Los ejemplos de secuencias de NMB se pueden encontrar en la base de datos en www.neisseria.org. Donde Hsf se menciona en esta memoria descriptiva, el término puede ser sustituible en cada caso por truncados de Hsf, en particular los descritos en el documento WO 01/55182.

Se prefiere particularmente si tanto Hsf como TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos [documento EP 586266], o Hsf y OMP85, u OMP85 y TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos), o NspA y Hsf, o NspA y OMP85, o NspA y TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos) están ambos regulados hacia niveles mayores. Donde 2 vesículas de la membrana externa están comprendidas en la composición, se prefiere que cada vesícula de la membrana externa tenga diferentes regulaciones hacia niveles mayores. Si TbpA alto y bajo se van a regular hacia niveles mayores, se prefiere que estos se regulen hacia niveles mayores en dos vesículas de la membrana externa separadas presentes en la composición derivada de 2 cepas que comprenden naturalmente las 2 formas de TbpA. Más preferiblemente, las dos cepas tienen inmunotipos de LOS L2 y L3. TbpA se puede regular hacia niveles mayores genéticamente o mediante desarrollo de las cepas de producción de *Neisseria/meningocócica* en condiciones limitadas de hierro por ejemplo en presencia de 50–70 µM de Desferal (mesilato de deferoxamina, disponible de Sigma). Si se toma el último planteamiento, se prefiere que el gen de expresión de FrpB se regule hacia niveles menores (preferiblemente suprimido) ya que este antígeno variable puede hacerse inmunodominante en vesículas de la membrana externa aisladas de cepas meningocócicas aisladas en condiciones limitadas y hierro.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende una vesícula de la membrana externa de L3 de una cepa m_{sb}^{B-} de polisacárido capsular de lgt_B^{B-} preferiblemente regulado hacia niveles mayores en TbpA alto y Hsf y una vesícula de la membrana externa de L2 de una cepa m_{sb}^{B-} de polisacárido capsular de lgt_B^{B-} preferiblemente regulado hacia niveles mayores en TbpA bajo y Omp85. Más preferiblemente ambas vesículas de la membrana externa están adicionalmente reguladas hacia niveles menores de expresión de PorA y/o FrpB y opcionalmente la expresión de OpC y/o OpA. Las vesículas de la membrana externa se aíslan más preferiblemente

mediante un procedimiento de DOC bajo como se ha descrito anteriormente y el LOS en ambas vesículas de la membrana externa está reticulado intra-vesícula de la membrana externa a la proteína de membrana externa.

Vacunas de células fantasma o enteras muertas

5 Los inventores contemplan que las composiciones y vacunas anteriores concernientes a las vesículas de la membrana externa se pueden fácilmente extender a procedimientos que conciernen a las preparaciones y vacunas de células fantasmas o enteras muertas (con idénticas ventajas) Los procedimientos para fabricar preparaciones fantasma (células vacías con envolturas intactas) de cepas Gram negativas se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo el documento WO 92/01791). Los procedimientos para matar células enteras para fabricar preparaciones de células inactivadas para uso en vacunas también se conocen bien. Por lo tanto las composiciones y vacunas que implican vesículas de la membrana externa descritas en todo este documento se contemplan para ser aplicables a las mismas composiciones o vacunas que comprenden preparaciones equivalentes de células fantasma y muertas enteras de la invención.

Ensayos bactericida en suero en la composición de la invención

15 El ensayo bactericida en suero es el procedimiento preferido para valorar relaciones sinérgicas entre antígenos cuando se combinan en una composición inmunogénica de la invención.

20 Tal respuesta sinérgica se puede caracterizar mediante el SBA provocado por la combinación de antígenos que son al menos 50 %, dos veces, tres veces preferiblemente cuatro veces, cinco veces, seis veces siete veces, ocho veces, nueve veces y más preferiblemente diez veces más alto que el SBA provocado por cada antígeno separadamente. Preferiblemente SBA se mide contra una cepa homóloga de la que se derivan los antígenos y preferiblemente también contra un panel de cepas heterólogas. (Véase más adelante para un panel representativo por ejemplo BZ10 (B:2b:P1.2) que pertenecen al grupo A-4; B16B6 (B2a:P1.2) perteneciente al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7, 16)). SBA es el marcador inmunológico comúnmente acordado para estimar la eficacia de una vacuna meningocócica (Perkins y col., J. Infect Dis. 1998, 177: 683–691). SBA se puede averiguar satisfactoriamente mediante cualquier procedimiento conocido. SBA se puede llevar a cabo usando sueros obtenidos de modelos de animales o de sujetos humanos.

30 Un procedimiento preferido de manejar SBA con sueros humanos es el siguiente. Se toma una muestra de sangre antes a la primera vacunación, dos meses después de la segunda vacunación y un mes después de la tercera vacunación (tres vacunaciones en un año siendo un programa de vacunación principal humana administrada en, por ejemplo, 0, 2 y 4 meses, o 0, 1 y 6 meses. Tales programas de vacunación principal humana se pueden llevar a cabo en niños de un año de edad (por ejemplo al mismo tiempo como se llevan a cabo las vacunaciones con Hib) o de 2–4 años de edad o adolescentes también se pueden vacunar para el SBA de ensayo con dicho programa de vacunación principal. Una muestra adicional de sangre se puede tomar 6 a 12 meses después de la vacunación principal y un mes después de la dosis de refuerzo, si es aplicable.

35 SBA será satisfactorio para un antígeno o preparación de vesículas de la membrana externa con actividad bactericida homóloga si un mes después de la tercera dosis de vacuna (del programa de vacunación principal) (en niños de 2–4 años de edad o adolescentes, pero preferiblemente en niños en el primer año de vida) el porcentaje de sujetos con un crecimiento cuatro veces en términos de título de SBA (dilución de anticuerpo) (comparado con el título de prevacunación) contra la cepa de meningococo de la que los antígenos de la invención se derivaban es mayor que el 30 %, preferiblemente mayor que el 40 %, más preferiblemente mayor que el 50 % y más preferiblemente mayor que el 60 % de los sujetos.

Ciertamente un antígeno o preparación de vesículas de la membrana externa con actividad bactericida heteróloga también puede constituir preparación de vesículas de la membrana externa con actividad bactericida homóloga si puede también provocar SBA satisfactoria contra la cepa meningocócica de la que se deriva.

45 SBA será satisfactorio para un antígeno o preparación de vesículas de la membrana externa con actividad bactericida heteróloga si un mes después de la tercera dosis de vacuna (del programa de vacunación principal) (en niños de 2–4 años de edad o adolescentes, pero preferiblemente en niños en el primer año de vida) el porcentaje de sujetos con un crecimiento cuatro veces en términos de título de SBA (dilución de anticuerpo) (comparado con el título de prevacunación) contra tres cepas heterólogas de meningococo es mayor que 20 %, preferiblemente mayor que 30 %, más preferiblemente mayor que 35 % y más preferiblemente mayor que 40 % de los sujetos. Tal ensayo es una buena indicación de si el antígeno o preparación de vesículas de la membrana externa con actividad bactericida heteróloga puede inducir anticuerpos bactericidas cruzados contra diversas cepas meningocócicas. Las tres cepas heterólogas deben preferiblemente tener complejo de tipo electroforético (abreviadamente ET) o configuración de tipo de secuencias multilocus (abreviadamente MLST) (véase Maiden y col., PNAS Estados Unidos 1998, 95: 3140–5) a cada otra y preferiblemente a la cepa de la que el antígeno o preparación de vesículas de la membrana externa con actividad bactericida heteróloga se fabrica o deriva. Una persona experta será capaz de determinar fácilmente tres cepas con complejo ET diferente que reflejan la diversidad genética observada entre meningococos, particularmente entre cepas de meningococo de tipo B que se reconocen que son la causa de la carga de enfermedad significativa y/o que representan líneas hipervirulentas de MenB reconocidas (véase Maiden

anteriormente). Por ejemplo tres cepas que se podrían utilizar son las siguientes: BZ10 (B:2b:P1.2) perteneciente al grupo A-4; B16B6 (B:2b:P1.2) perteneciente al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7, 16) perteneciente al complejo ET-5, o cualquiera otra cepa perteneciente al mismo grupo ET. Dichas cepas se pueden usar para ensayar un antígeno o preparación de vesículas de la membrana externa con actividad bactericida heteróloga fabricada o derivada de, por ejemplo, la cepa meningocócica CU385 (B:4:P1.5) que pertenece al complejo ET-5. Otra cepa de muestra que se podría utilizar es del clon epidémico de la línea 3 (por ejemplo NZ124 [B:4:P1.7, 4]. Otra cepa de ET-37 es NGP165 (B:2a:P1.2).

Los procedimientos para medir la actividad de SBA se conocen en la técnica. Por ejemplo un procedimiento que podría usarse se describe en el documento WO 99/09176 en el ejemplo 10C. En términos generales, un cultivo de la cepa a ensayarse se desarrolla (preferiblemente en condiciones de supresión de hierro mediante adición de un agente quelante de hierro tal como EDDA al medio de crecimiento) en la fase logarítmica de crecimiento. Esto se puede suspender en un medio con BSA (tal como medio de Hanks con BSA al 0,3 %) con el fin de obtener una suspensión de células de trabajo ajustada a aproximadamente 20000 UFC/ml. Una serie de mezclas de reacción se pueden preparar mezclando una serie de diluciones dos veces de sueros a ensayarse (preferiblemente inactivados por calor a 56 °C durante 30 minutos) [por ejemplo en un volumen de 50 µl/pocillo] y la suspensión a ensayarse de la cepa meningocócica de 20000 UFC/ml [por ejemplo en un volumen de 25 µl/pocillo]. Los viales de la reacción se deben incubar (por ejemplo 37 °C durante 15 minutos) y agitarse (por ejemplo a 210 rpm). La mezcla final de reacción [por ejemplo en un volumen de 100 µl] adicionalmente contiene una fuente de complemento [tal como 25 % de volumen final de suero de conejo pequeño preensayado, o suero humano para serología humana] y se incuba como antes [por ejemplo 37 °C durante 60 minutos]. Se puede usar para este ensayo una placa de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos de poliestireno estéril. Una alícuota [por ejemplo 10 µl] se puede tomar de cada pocillo usando una pipeta multicanal y gotearse en placas de agar de Mueller–Hinton (conteniendo preferiblemente 1 % de Isovitalax y 1 % de suero de caballo inactivado por calor) e incubadas (por ejemplo durante 18 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %). Preferiblemente, se pueden contar colonias individuales hasta 80 UFC por alícuota. Las siguientes tres muestras de ensayo se pueden utilizar como controles: tampón + bacterias + complemento; tampón + bacterias + complemento inactivado; suero + bacterias + complemento inactivado. Los títulos de SBA se pueden calcular sencillamente usando un programa que procesa los datos para dar una medida de la dilución que corresponde al 50 % de muerte celular mediante un cálculo de regresión.

30 Ejemplos

Los ejemplos citados más adelante se llevan a cabo usando técnicas convencionales, que se conocen bien y rutinariamente por los expertos en la técnica, excepto donde de otra manera se describe en detalle. Los ejemplos son ilustrativos pero no limitan la invención.

Ejemplo 1

Los ejemplos describen genes de supresiones que codifican proteínas implicadas en la producción de polisacáridos capsulares B de meningococo B, la supresión del gen PorA, la regulación hacia niveles mayores de diversas proteínas de membrana externa en la superficie de vesículas de la membrana externa meningocócicas, la regulación hacia niveles menores de proteínas inmunodominantes o enzimas biosintéticas y procedimientos para aislar vesículas de la membrana externa se describen en el documento WO 01/09350.

40 Ejemplo 2: LOS: un antígeno protector cruzado clave

Para valorar el papel de LOS como un antígeno protector cruzado potencial, la cepa de meningococo B H44/76 de tipo salvaje (abreviadamente WT) (que expresa LOS L3) y una cepa H44/76 modificada que expresa un "LOS de tipo galE" (con una estructura corta como para un LOS lgtE⁻) se usaron para producir vesículas de la membrana externa según dos procedimientos diferentes. El primer procedimiento usaba 0,1 % de DOC con el fin de tener altos niveles de LOS en vesículas de la membrana externa, el segundo usaba 0,5 % de DOC para tener bajos niveles de LOS en las vesículas de la membrana externa resultantes.

Los ratones recibieron tres inyecciones (el día 0, 21 y 28) por vía IM de 5 µg de vesículas de la membrana externa adsorbidas en sales de Al³⁺ (fosfato de aluminio) y 3D-MPL por dosis. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la tercera inyección.

ELISA de LOS anti-L3 se hizo de en sueros combinados y usando LOS L3 purificado. Los resultados en la figura 3A muestran claramente que el procedimiento con 1 % de DOC producía vesículas de la membrana externa capaces de provocar una respuesta anti-LOS en ratones. Esto demuestra que LOS galE⁻ y LOS L3 son capaces de inducir la producción de anticuerpos. Por otra parte 0,5 % de DOC extraía demasiado LOS con el fin para él de actuar como un antígeno clave en la vacuna de vesículas de la membrana externa.

55 Ensayos bactericidas en suero

SBA se realizó en sueros individuales usando diferentes cepas de NmenB: la cepa WT H44/76 homóloga, una cepa

PorA(-) H44/76 y dos cepas heterólogas (basadas en subtipo suero) Cu385 y NZ124. Estas cuatro cepas expresan un LOS L3. Se añade una quinta cepa. Comparada con H44/76, esta cepa (B16B6) es heteróloga no solamente para PorA sino también para LOS (es una cepa de inmunotipo L2).

5 Los resultados en la figura 3B una respuesta bactericida cruzada solamente cepas L3 pero solamente con las vesículas de la membrana externa de 0,1 % de DOC WT. No se observó respuesta bactericida cruzada para vesículas de la membrana externa galE' de 0,1 % de DOC y vesículas de la membrana externa WT de 0,5 % de DOC. Además, se conoce bien que la respuesta bactericida inducida por anticuerpos PorA es serotipo dependiente. Esto también se observó en esta experimento con bien vesículas de la membrana externa WT de 0,5 % de DOC o vesículas de la membrana externa de galE' y también con datos de SBA hechos con la cepa PorA(-) H44/76.

10 Todos estos resultados sugieren que la respuesta bactericida cruzada inducida por vesículas de la membrana externa que contienen alto porcentaje de LOS L3 se debe a la producción de Abs dirigida contra el antígeno LOS.

Solamente el LOS L3 (y no el LOS galE') es capaz de provocar la producción de anticuerpos bactericidas. Aunque, en ELISA se observó una buena respuesta anti-LOS con vesículas de la membrana externa galE' de 0,1 % de DOC, esta respuesta no es biológicamente relevante (no SBA).

15 Además parece también que la respuesta es específica de inmunotipo de LOS como Abs LOS anti-L3 matan solamente las cepas L3 pero no las cepas L2, indicando que una vacuna óptima debe contener idealmente LOS L3 y L2 para cobertura óptima.

Experimento de supresión

20 Con el fin de demostrar que la respuesta inducida por vesículas de la membrana externa WT de DOC al 0,1 % se debe principalmente a los anticuerpos anti-LOS, combinaciones de suero se suprimieron con diferentes concentraciones de LOS L3 purificado. Después de la supresión se usaron sueros en un ensayo bactericida contra la cepa homóloga WT H44/76.

25 Los resultados obtenidos (véase la figura 3C) con sueros activados contra vesículas de la membrana externa WT de 0,1 % de DOC muestran una clara inhibición de dosis-intervalo, demostrando que la mayoría de los anticuerpos inducidos por esta preparación se dirigen contra LOS (confirmando los resultados de SBA generados con la cepa PorA(-) H44/76. En contraste, la respuesta inducida por WT 0,5 % de DOC no se dirige contra LOS como se demuestra por SBA hecho con la cepa PorA(-) H44/76 y también indicada por la supresión de LOS.

Este resultado se mantiene probablemente para LOS L2.

30 **Ejemplo 3:** Experimentos con vesículas de la membrana externa de L3 e intermedio (lgtB') exentas de DOC (LOS no detoxificado) indujeron anticuerpos bactericida cruzados

La cepa derivada de meningococos MC58 usada es B:P,7,16, *opc-*, *siaD-*. Esta cepa se modificó genéticamente para expresar bien L3 (cepa 2G2) o un epítipo intermedio (cepa 2G EcoN1b-1, como 2G2 pero adicionalmente *lgtB'*) o un LPS en versión corta (cepa C6, que es *lgtE'*). OMV se produjeron según bien un procedimiento de DOC (0,5 %) a concentración alta normal o procedimiento exento de DOC.

35 Se inmunizaron ratones (10 por grupo) tres veces mediante la vía intramuscular el día 0, 20 y 28. Recibían 1 o 10 µg (contenido en proteína) de vesículas de la membrana externa formuladas en Al(OH₃) Se tomaron muestras de sangre el día 28 (posición II) y día 42 (posición III).

Se hicieron ensayos bactericidas en sueros combinados y utilizando cepas homólogas (MC58 y H44/76) y dos cepas heterólogas (M97250687 y M972078) con suero de conejo pequeño como fuente de complemento exógeno.

40 La siguiente tabla resume los resultados (títulos bactericidas para 50 % de muerte):

		Cepa y serotipo			
Antígeno	Muestras de sangre	MC58 P1.7.16	H44/76TT P1.7.16	M97250687 P1.19.15	M97252078 P1.A
c6 no doc 10 ug IM	Posición II	> 2560	> 2560	> 2560	98
c6 no doc 10 ug IM	Posición III	1353	> 2560	> 2560	90
c6 no doc 1 ug IM	Posición II	247	620	247	< 20
c6 no doc 1 ug IM	Posición III	411	878	748	< 20
2g2 no doc 10 ug IM	Posición II	> 320	> 2560	> 2560	> 2560

2g2 no doc 10 ug IM	Posición III	> 2560	> 2560	> 2560	1407
2g2 no doc 1 ug IM	Posición II	> 2560	> 2560	> 2560	119
2g2 no doc 1 ug IM	Posición III	> 2560	> 2560	> 2560	348
2gecoN 1b-1no doc 10 ug IM	Posición II	> 2560	> 2560	> 2560	1162
2gecoN 1b-1no doc 10 ug IM	Posición III	> 2560	> 2560	> 2560	1213
2gecoN 1b-1no doc 1 ug IM	Posición II	1151	> 2560	1696	22
2gecoN 1b-1no doc 1 ug IM	Posición III	2220	> 2560	1947	135
c6 doc 10 ug IM	Posición II	308	248	341	< 20
c6 doc 10 ug IM	Posición III	189	104	400	< 20
c6 doc 1 ug IM	Posición II	33	43	63	< 20
c6 doc 1 ug IM	Posición III	NC (> 20)	24	156	< 20
2g2 doc 10 ug IM	Posición II	NC (> 20)	25	360	< 20
2g2 doc 10 ug IM	Posición III	201	< 20	647	< 20
2g2 doc 1 ug IM	Posición II	275	< 20	299/644	< 20
2g2 doc 1 ug IM	Posición III	237	< 20	728	< 20
2gecoN 1b-1doc 10 ug IM	Posición II	573	31	685	< 20
2gecoN 1b-1doc 10 ug IM	Posición III	NC (> 40)	21	1140	< 20
2gecoN 1b-1doc 1 ug IM	Posición II	261	NC	118	< 20
2gecoN 1b-1doc 1 ug IM	Posición III	348	NC	692	< 20

Claramente la presencia de L3 (2g2) o epítipo intermedio (2 gecon 1b-1) induce anticuerpos bactericidas cruzados, mientras las vesículas de la membrana externa de la cepa LPS truncada (C6) induce un nivel inferior de anticuerpos de reacción cruzados. Esto se ilustra particularmente cuando se inyectó 1 μ de OMV.

- 5 Además, como se muestra con OMV purificadas con DOC, reduciendo el contenido de LPS de las burbujas se reduce la inducción de anticuerpos bactericidas cruzados. Aparte de LPS aumentado, es posible que vesículas de la membrana externa exentas de DOC puedan retener ventajosamente algunas proteínas que interactúan perdidamente con los OMV tales como lipoproteínas.

Ejemplo 4: Reticulación intra vesículas de la membrana externa de LOS L3 y proteína de membrana externa

- 10 Las vesículas de la membrana externa de MenB utilizadas se derivan de una cepa H44/76 (LOS de inmunitipo de L3) que era SiaD⁻ (de este modo no expresando polisacárido capsular) y PorA⁻. Se utilizaron dos cepas diferentes: un completo L3 (cepa B1717, siad (-) Por A (-) completo L3) y un truncado L3 (cepa B1727, siad (-) PorA(-) IgtB(-) TrL3).

- 15 El procedimiento de conjugación de EDAC/NHS se utilizó según procedimientos conocidos para reticular LOS y OMP en las vesículas de la membrana externa para obtener el componente de oligosacárido de LOS un antígeno T dependiente (EDAC/NHS se prefiere a formaldehído que se encontró reticular demasiado alto una extensión que afectaba de este modo adversamente la filtrabilidad). EDAC reacciona con ácidos carboxílicos para crear un intermedio de éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina, se forma un enlace de amida con liberación de un subproducto de isourea. Sin embargo, la eficacia de una reacción mediada por EDAC se puede incrementar mediante la formación de un intermedio de éster Sulfo-NHS. El éster sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más tiempo que el éster formado de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De este modo se pueden llevar a cabo rendimientos más altos de la formación de enlace de amida usando este procedimiento en dos etapas. La conjugación de EDAC/NHS se describe en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220–222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173–176.

La mezcla de reacción contenía 1,5 mg de Sulfo-NHS y 5 mg de EDAC en sacarosa al 3 % (para estabilidad de

vesícula de la membrana externa) en un volumen final de 1 ml. Las vesículas de la membrana externa estaban presentes en una relación de 0,025 mg EDAC/mg de vesículas de la membrana externa. Las vesículas de la membrana externa estaban presentes en una concentración de 2 mg/ml y el pH se ajustó hasta 7,5 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N.

- 5 La reacción se dejó durante 4 horas a temperatura ambiente y se dializó la mezcla contra tampón fosfato 2 mM que contenía sacarosa al 3 %, pH 7,5. Después la mezcla se filtró sobre Sterivex G10 0,22 µm. Se recuperó una producción de 99 % de vesículas de la membrana externa.

10 La reacción podría seguirse en una transferencia de Western usando anti.L3 mAb. Mediante la reacción del bajo LOS MW se llega a hacer más débil y una nueva banda de MW más alta aparece en el gel. Esta banda de MW más alta parece predominar y puede representar la mayoría de LOS conjugados que llega a estar covalentemente unido a PorB.

15 Se encontró que EDAC es un agente excelente de reticulación intra-vesículas de la membrana externa en que reticulaba LOS a OMP irreversiblemente y suficientemente para inmunogenicidad T dependiente de LOS mejorada, pero no se reticulaba a tan alto grado que sucedían problemas tales como escasa filtrabilidad, agregación y reticulación intra-vesículas de la membrana externa. La morfología de las vesículas de la membrana externa generadas es similar a la de las vesículas de la membrana externa no conjugadas (como se observó mediante micrografía electrónica). Además el protocolo anterior evitaba que tuviese lugar una reticulación demasiado alta (que puede disminuir la inmunogenicidad de OMP protectoras presentes naturalmente en la superficie de la vesícula de la membrana externa, por ejemplo TbpA).

20 **Ejemplo 5: L3 y L3 truncado (intermedio lgtB-) pueden inducir la producción de Abs bactericida que reconoció LOS L3 truncado (intermedio lgtB; TrL3)**

25 OMV (vesículas de la membrana externa) se produjeron de la cepa de MenB H44/76 siaD- PorA- L3 o de H44/76 siad- porA TrL3. Se realizaron dos extracciones diferentes; el porcentaje de DOC usado era bien 0,1 % o 0,5 %. También se evaluaron dos formulaciones diferentes de adyuvante: Al(OH)₃ o fosfato de aluminio + 3D-MPL. Ratones (hembras de ratones OF1, 6–8 semanas de edad, 30 por grupo) se inyectaron 3 veces (en los días 0, 21 y 28) por vía IM (5 µg de vesículas de la membrana externa / inyección). SBA se recogió en la posición II (día 28) y la posición III (día 42) los sueros (sueros combinados o sueros individuales).

30 El título de media geométrica y el título de sueros combinados para 50 % de muerte celular era mayor para los sueros inducidos mediante vesículas de la membrana externa extraídas con 0,1 % de DOC comparado con la extracción de 0,5 % de DOC. Esto se explica probablemente por el hecho que allí tiende a ser 2,5 veces como mucho de LOS en las vesículas de la membrana externa anteriores comparada con la última. No había diferencia significativa entre SBA de suero inducido con las vesículas de la membrana externa que contienen LOS L3 completo o LOS L3 truncado. Hay un incremento en SBA si las vesículas de la membrana externa se adyuvan con fosfato de aluminio + 3D-MPL comparado con hidróxido de aluminio.

35 También se hicieron experimentos de supresión de sueros. Los sueros se suprimieron usando 1 mg/ml de L3 o LOS trL3 purificados y después se realizaron SBA sobre estos sueros suprimidos. Los resultados mostraban que Abs bactericida (que contenía anticuerpos anti-L3) su puede suprimir casi completamente mediante pretratamiento de LOS trL3 de sueros, y Abs bactericida (que contenía anticuerpos anti-trL3) se puede casi suprimir completamente mediante pretratamiento con LOS L3 de sueros. Abs bactericida anti-L3 son de este modo capaces de reaccionar con LOS trL3 y Abs bactericida anti-trL3 son de este modo capaces de reaccionar con LOS trL3. Además, de este modo se han demostrado la especificidad de Abs bactericida para una estructura de LOS presente en ambos L3 y LOS trL3.

40 En conclusión, los autores han demostrado que la estructura de TrL3 (en las OMV) es capaz de inducir la producción de Abs bactericida contra cepas L3. En combinación con los experimentos de supresión, los autores han mostrado que TrL3 y LOS L3 son estructuras muy próximas en una base inmunológica, y trL3 se puede utilizar para generar Ab capaz de matar cepas L3.

Ejemplo 6: TrL3 soluciona el problema potencial de autoinmunidad con la estructura de L3 completa

45 Si las estructuras L3 y trL3 están tan próximamente relacionadas inmunológicamente en términos de anticuerpos protectores, ¿hay alguna diferencia entre las estructuras con respecto a las posibles cuestiones de autoinmunidad asociadas con LOS L3 (y L2) [mediante el resto de lacto-N-neotetraosa]? Los autores han dirigido esta cuestión mirando si las crioaglutinina son capaces de reconocer LOS trL3.

MAB 1B2-1B7 (J Bio Chem 256(1981) 10967–10972; y depósito de ATCC número TIB–189) se conoce que aglutinan los glóbulos rojos de adultos de seres humanos (RBC) a bajas temperaturas y reaccionan con LNnT (lacto-N-neotetraosa). Esto es una crioaglutinina típica.

55 Se utilizó el anticuerpo monoclonal en el siguiente experimento en conjunción con un anticuerpo monoclonal MabL3,7,9 que es capaz de matar cepas meningocócicas L3.

Estos dos mAbs se utilizaron en ELISA con microplacas prrrecubiertas con poli-L-lisina (1 µg/ml, 2 h a 37 °C) y después de recubrieron con L3 purificado o LOS TrL3 purificado (5 µg, durante una noche a 4 °C). Después las placas se saturaron con BSA (1 %, 30 minutos a temperatura ambiente). Después se llevó a cabo un ELISA convencional con cada uno de los 2 anticuerpos.

5 Los resultados (figura 4) muestran claramente que Mab L379 reacciona con L3 y TrL3 (figura 4B) pero 1B2-1B7 reacciona solamente contra LOS L3 (figura 4A). De este modo los autores pueden decir que TrL3 no se reconoce por crioaglutinina que reacciona contra estructuras que contienen tetrasacárido LNnT (tal como LOS L3 y glóbulos rojos de seres humanos).

10 De este modo LOS TrL3 tiene las características óptimas de ser mucho tiempo suficiente capaz para retener epítopos protectores, pero brevemente suficientes para perder epítopos que pudieran tener implicaciones autoinmunes en seres humanos.

No existe razón para sugerir que esto no debe también ser el caso para la estructura de LOS L2 (IgtB-) truncada propuesta en esta solicitud de patente.

15 **Ejemplo 7: Impacto de reticulación en la pirogenicidad/antigenicidad de vesículas de la membrana externa B1820 0,1 % de DOC**

20 Vesículas de la membrana externa (de la cepa B1820; que se derivaban de H44/76 con siaD(-) PorA(-) FrpB(-)Hsf truncado regulado hacia niveles mayores, L3 truncado mediante la cepa de mutación lbtB(-), cultivadas en presencia de desferral, se extrajeron las vesículas de la membrana externa con 0,1 % de DOC se reticularon utilizando diferentes concentraciones de EDAC (cuanto más de EDAC está presente, más se reticulan la vesículas de la membrana externa). La reticulación es intra-vesícula de la membrana externa como se muestra mediante filtración estéril de las vesículas de la membrana externa.

25 El contenido en LOS en las vesículas de la membrana externa es 18 % como se mide mediante tinción con plata después de electroforesis de SDS-PAGE utilizando LOS L3 Nmen purificado como patrón (Tsai, J. Biol. Standardization (1986) 14: 25–33). En general el contenido de LOS en las vesículas de la membrana externa extraídas con 0,1 % de DOC es alrededor de 20 % de LOS, con 0,2 % de DOC es alrededor de 15 % de LOS, con 0,3 % de DOC es alrededor de 10 % de LOS y con 0,5 % de DOC es alrededor de 5 % de LOS. En general las vesículas de la membrana externa que comprenden 10 % de LOS sin conjugar o más son inaceptablemente pirógenas.

Pirogenicidad en conejos

30 Se ensayaron dos formulaciones (vesículas de la membrana externa absorbidas en Al(OH)₃ o AlPO₄) y los conejos recibieron 500 ng/kg por vía IV en un ensayo de pirogenicidad como se describe en la Farmacopea Europea.

35 Los resultados muestran claramente (en la tabla más adelante) un impacto positivo de la reticulación intra-vesícula de la membrana externa en la pirogenicidad de las vesículas de la membrana externa. El mismo lote de vesículas de la membrana externa se utilizó como control o se reticularon con diferentes concentraciones de EDAC. Cuanto más se reticulaban las vesículas de la membrana externa (más EDAC) eran menos pirógenas. Esto se observó para dos diferentes formulaciones.

Tratamiento	Formulación		
	Al(OH) ₃	AlPO ₄	Ambas formulaciones [§]
No reticuladas	3,1*	2,8	5,9
EDAC 0,05 [‡]	2,7	2,2	4,9
EDSC 0,2	1,7	1,7	3,4
EDAC 1	1,5	1,4	2,9

[‡] concentración de EDAC: mg de EDAC por mg de vesículas de la membrana externa

* suma de incremento de temperatura (°C) individual (3 conejos por grupo)

[§] suma de seis conejos (3 del grupo de Al(OH)₃ y 3 para el grupo de AlPO₄)

Antigenicidad de vesículas de la membrana externa reticuladas

La antigenicidad de las vesículas de la membrana externa anteriores (no adsorbidas) se valoró para determinar si la reticulación tenía algún impacto en la antigenicidad de las vesículas de la membrana externa. Las diferentes preparaciones de vesículas de la membrana externa (reticuladas o no) se recubrieron en una microplaca (10 µg/ml, durante una noche a 4 °C). Después de lavado y saturación, se añadieron a la placa dilución en serie de MAb L379 o sueros de ratones inmunizados con B1820 DOC al 0,1 o al 0,5 % (30 minutos a temperatura ambiente con agitación). La fijación de anticuerpos en vesículas de la membrana externa recubiertas se revelaba usando anti-ratón Ig acoplado a biotina después usando un complejo de estreptavidina-peroxidasa seguido de un revelado usando OPD y H₂O₂. La densidad de cada micropocillo se medía usando un lector de microplacas.

Los resultados muestran que MAb L739 (dirigida contra LOS L3 pero también capaz de reaccionar con LOS TrL3 (el mutante lgtB) y bactericida contra cepas L3) reconoce equivalentemente vesículas de la membrana externa B1820 (sin conjugar) no tratadas y las diferentes vesículas de la membrana externa reticuladas (sea la que sea la concentración de EDAC utilizada). Véase la figura 5A. La respuesta más alta obtenida con 0,2 y 1 de EDAC podría reflejar un mejor anclaje de LOS en las vesículas de la membrana externa o al menos una mejor estabilidad de LOS en vesículas de la membrana externa reticuladas a estas concentraciones de EDAC.

También se utilizó suero de ratones para valorar la antigenicidad de estas vesículas de la membrana externa. Se utilizaron dos diferentes tipos de sueros; el primero se obtuvo de ratones inmunizados con vesículas de la membrana externa B1820 0,5 % de DOC (vesículas de la membrana externa con bajo contenido en LOS ≤ 8 % induciendo principalmente anticuerpos antiproteína). El segundo suero se obtuvo de ratones inmunizados con vesículas de la membrana externa B1820 0,1 % de DOC (vesículas de la membrana externa con contenido en LOS ≥ 15 % induciendo Abs bactericida cruzado dirigido principalmente contra LOS) Como se observa con MAb, L379 los resultados obtenidos con estos dos sueros (figura 5 B y 5C respectivamente) no mostraban ninguna diferencia entre vesículas de la membrana externa no tratadas (sin conjugar) y vesículas de la membrana externa reticuladas (sea la que sea la concentración de EDAC utilizada).

En conclusión, parece que la antigenicidad de LOS no se afectaba por la reticulación y que la antigenicidad “global” de las vesículas de la membrana externa tampoco se modificaba por el tratamiento de EDAC. Los experimentos de inmunogenicidad en ratones están en curso para confirmar que la reticulación (con altas concentraciones de EDAC) no destruye la inmunogenicidad de antígenos protectores clave. Sin embargo, los resultados preliminares (ejemplo 8) muestran donde la reticulación se hizo con 0,05 de EDAC en vesículas de la membrana externa extraídas con 0,5 % de DOC indicaban un incremento en la inmunogenicidad de estas vesículas de la membrana externa después de tratamiento con EDAC.

Ejemplo 8: Inmunogenicidad de vesículas de la membrana externa reticuladas (química con 0,025 mg de EDAC)

En este experimento se produjeron vesículas de la membrana externa de la cepa B1727. Esta cepa es una cepa modificada genéticamente de H44/76, que es siaD(-) PorA(-) trL3 (lgtB) Hsf+TbpA regulada hacia niveles mayores) Se extrajeron las vesículas de la membrana externa utilizando 0,5 % de DOC. Se inmunizaron los ratones tres veces (los días 0, 21 y 28) por vía IM. Por inyección, recibían 5 µg de vesículas de la membrana externa adsorbidas en Al(OH)₃.

Se realizó un ensayo bactericida en suero contra la cepa H44/76 en sueros individuales tomados 14 días después de la tercera inyección. Los resultados muestran un impacto positivo de tratamiento de EDAC sobre el número de respondedores (número de ratones con título de SBA > 100): 37 % de respondedores para vesículas de la membrana externa tratadas con EDAC y solamente 17 % con vesículas de la membrana externa no modificadas.

La ausencia de 3D-MPL en formulación y el relativamente bajo porcentaje de LOS en las preparaciones de vesículas de la membrana externa (alrededor de 5 %) después de extracción con 0,5 % de DOC explican la bajas respuestas.

Ratones	B1727 SiaD (-) PorA (-) TrL3 TbpA–Hsf Reticulación “EDAC”	Vesículas de la membrana externa B1727 SiaD (-) PorA (-) TrL3 TbpA–Hsf Sin tratamiento
GMT	52	27
SBA en combinaciones	249	60
Respondedores	11/30	5/30

También se realizó un ELISA de anti-Hsf para determinar si la reticulación tiene un impacto en la inmunogenicidad de esta proteína. Los resultados (obtenidos en sueros combinados) indican que la reticulación no tiene impacto en la respuesta de Ig anti-Hsf. No se detectó IgM.

	ELISA de anti-Hsf	
	IgM	IgG
B1727 Siad (-) PorA (-) TbpA– HsfTrL3 Reticulación “EDAC”	50	18140
B1727 Siad (-) PorA (-) TbpA-Hsf TrL3	50	15627
Control negativo	50	50

5 **Ejemplo 9: Datos de LOS TrL3**

El siguiente experimento valoraba:

- el impacto de LOS L3 (IgtB(-)TrL3) en la inducción de Abs capaz de reaccionar con LNnT (lacto-N-neotetraosa);
- la inducción de anticuerpos bactericidas de la construcción anterior.

10 Se produjeron las vesículas de la membrana externa a partir de dos cepas genéticamente modificadas de H44/76. Ambas eran siaD() PorA-) pero una producía un WT L3 LOS y la segunda un LOS TrL3 (IgtB(-)). Estas vesículas de la membrana externa se produjeron según dos procedimientos diferentes con el fin de tener alto contenido en LOS (alrededor de 18 %, usando extracción con 0,1 % de DOC) o bajo contenido en LOS próximo al 5 %, usando extracción con 0,5 % de DOC).

15 Los ratones se inmunizaron tres veces (los días 0, 21 y 28) por vía IM con 5 µg de vesículas de la membrana externa (por inyección) adsorbidas en Al(OH)₃ con o sin 3D-MPL.

ELISA de anti-LNnT

20 Procedimiento: se recubrieron microplacas con LNnT conjugado a albúmina sérica de tipo humano mediante un espaciador (ADH) (5 µg de conjugados por ml en PBS, 100 µg por micropocillo). Después de una incubación durante una noche a 4 °C, se lavaron las placas y se saturaron con 1 % de PBS-BSA (40 minutos a temperatura ambiente). Después de lavado, se diluyeron en serie en 0,2 % de PBS-0,5 % de BSA.

Se añadió Tween 20 (30 minutos a temperatura ambiente). La fijación de IgG a LNnT se reveló mediante anti-ratón-IgG acoplado a peroxidasa(Jackson) seguido de incubación con OPDA y H₂O₂.

25 Resultados: El control positivo es 1B2-1B7 MAb. Este MAb reacciona con LNnT y con LOS L3 (pero no LOS TrL3) (véase ejemplo anterior) y aglutina los glóbulos rojos de seres humanos. El control negativo (-) es forma de sueros de ratones inmunizados con adyuvante solo.

30 Los resultados (figura 6) muestran claramente que solamente las vesículas de la membrana externa de L3 con alto contenido en LOS (0,1 % de DOC) inducen la producción de IgG capaz de reaccionar con LNnT. Las vesículas de la membrana externa de Tr L3 con un contenido similar de LOS no inducen la producción de IgG dirigida contra LNnT, como no ambas preparaciones de vesículas de la membrana externa que contienen menor cantidad de LOS (0,5 % de DOC).

SBA en la cepa H44/76

35 Se realizaron ensayos de SBA contra la cepa H44/76 en sueros individuales tomados 14 día después de la tercera inyección. Los resultados muestran claramente más adelante que vesículas de la membrana externa LOS trL3 (IgtB(-))inducen niveles similares de anticuerpos bactericidas que LOS L3 (véase GMT pero también el número de ratones con el título de SBA > 1/100 (=SC)).

Formulación	Vesículas de la membrana externa L3		Vesículas de la membrana externa TrL3	
	DOC	DOC	DOC	DOC
	0,5 %	0,1 %	0,5 %	0,1 %

Al(OH)₃ + MPL	GMT	331	4125	1029	3204
	SC	19/30	29/30	27/30	30/30
Al(OH)₃	GMT	169	2029	138	828
	SC	14/30	29/30	13/30	30/30

Ejemplo 10: Eliminación de FrpB

Los siguientes datos son un sumario de dos experimentos preclínicos.

5 En estos experimentos dos cepas genéticamente modificadas de H44/76 se utilizaron para producir vesículas de la membrana externa usando 0,1 % de DOC. Las vesículas de la membrana externa obtenidas mediante este procedimiento tienen un contenido en LOS próximo a 20 %.

Las dos cepas de H44/76 eran las siguientes:

- B1733: siaD(-) Por A(-) Tr (truncada) Hsf regulada hacia niveles mayores IgtB(-)
- B1820: siaD(-) Por A(-) TrHs regulada hacia niveles mayores IgtB(-) FrpB(-)

10 Las vesículas de la membrana externa se produjeron después de que las cepas se desarrollaran en presencia de desferral para regular hacia niveles mayores la producción de proteínas dependientes de hierro tales como LbpA/B, TbpA/B, FrpB (en B1733), etc.

15 Las diferentes preparaciones de vesículas de la membrana externa se adsorbieron en Al(OH)₃ y se inyectaron en ratones por vía IM dos veces, con una separación de tres semanas. Se tomaron muestras de sangre 7 días después de la segunda administración. Los ratones recibían por inyección 5 µg de vesículas de la membrana externa.

Resultados de SBA

20 Se realizaron ensayos bactericidas en tres cepas de L3 (la cepa de tipo salvaje homóloga H44/76 y dos cepas heterólogas de L3: NZ124 y M97250687. Los resultados muestran claramente que las vesículas de la membrana externa (B1820) FrpB(-) (eliminación) inducen una mejor respuesta bactericida cruzada heteróloga (títulos altos y mejor seroconversión (abreviadamente SC)) que las vesículas de la membrana externa (B1733) FrpB(+). La respuesta homóloga, aunque se reducía mediante la supresión de FrpB, es todavía satisfactoria.

25 Estos datos sugieren que FrpB es un mayor conductor en la respuesta inmune provocada por vesículas de la membrana externa, pero, como esta proteína de membrana externa es altamente variable, los anticuerpos dirigidos contra esta proteína son solamente capaces de inducir la muerte de la cepa homóloga. La supresión de FrpB en la cepa de producción de vesículas de la membrana externa es por lo tanto un medio ventajoso de mejorar la cobertura de la vacuna de vesículas de la membrana externa producida.

Vesículas de la membrana externa	H44/76		M97250687		NZ124	
	GMT	SC	GMT	SC	GMT	SC
B1733	1518	30/30	151	11/30	70	4/29
B1820	781	19/30	1316	24/30	276	19/30

Ejemplo 11: Impacto de la mutación de msbB (lpxL1) sobre la pirogenicidad de vesículas de la membrana externa

Dos cepas de NmenB se utilizaron para esta evaluación:

- 30
- la cepa de control que es galE(-) [y de este modo incapaz de fabricar polisacárido capsular]
 - la cepa mutante *msbB*: que es galE(-) y msbB(-)

35 Las vesículas de la membrana externa se produjeron a partir de estas dos cepas usando 0,1 % de DOC con el fin de tener más de 15 % de contenido en LOS en las OMV (vesículas de la membrana externa). Como se ha establecido en los ejemplos previos, las preparaciones de vesículas de la membrana externa con un contenido en LOS mayor que 10 % no son satisfactorias desde un punto de vista de pirogenicidad y fracasa el ensayo de pirogenicidad en conejos de la Farmacopea Europea.

ES 2 537 737 T3

Las vesículas de la membrana externa anteriores se formularon en Al(OH)₃ (50 µg de OMV(500 µg de sales de Al₃) para un ensayo de pirogenicidad en ratones (500 ng de vesículas de la membrana externa/kg inyectados por vía IV).

Los resultados más adelante demuestran claramente que la supresión de *msbB* (particularmente en una cepa incapaz de fabricar polisacárido capsular) permite la producción de vesículas de la membrana externa que son no pirógenas en conejos incluso para un contenido en LOS mayor que 15 %.

5

Vesículas de la membrana externa	Dilución	Incremento de tº individual (°C)	<u>Suma de tº</u>	<u>Conclusión</u>
Control 0,1 % de DOC	0,5 µg/kg	0,7–1,4–1,2	3,3	Fracaso
msbB(-) 0,1 % de DOC	0,5 µg/kg	0,1–0,2–0,2	0,5	Pasa
Reglas de la Farmacopea Europea:				
<ul style="list-style-type: none"> - "Pasa" si la suma de tº individuales < 1,15 °C - "Fracasa si no repite" si la suma de tº individuales está entre 1,15 °C y 2,65 °C - "Fracasa" si la suma de tº individuales > 2,65 °C 				

Conclusión:

Una composición que comprende vesículas de la membrana externa L3 y L2 derivadas de cepas meningocócicas que tienen las mutaciones *lgtB*(-) y *msbB*(-) y se extraen con bajas concentraciones de deoxicolato (por ejemplo, 0,1 %) proporciona una base fuerte para una vacuna eficaz segura contra meningococo B. Las cepas de producción de vesículas de la membrana externa son idealmente deficientes en síntesis de polisacárido capsular y las vesículas de la membrana externa tienen LOS que están reticulados intra-vesícula de la membrana externa a la proteína de membrana externa. Cualquier o ambas de *PorA*(-) y *FrpB*(-) son de ayuda adicional en la mejora de la eficacia bactericida cruzada, como lo son regulaciones hacia niveles mayores de antígenos Hsf y/o TbpA.

10

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* derivada de una cepa de *Neisseria* con un inmutotipo LOS L2 o una cepa de *Neisseria* con un inmutotipo LOS L3, y en la que la cepa es IgtB⁻, o una preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* que comprende una combinación de vesículas de la membrana externa derivadas de una cepa de *Neisseria* con un inmutotipo LOS L2 y una cepa de *Neisseria* con un inmutotipo LOS L3, en la que cada cepa es IgtB⁻.
2. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 1, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* son meningocócicas.
- 10 3. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 2, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* son del serogrupo B.
4. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de las reivindicaciones 1-3, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* no pueden sintetizar polisacárido capsular.
- 15 5. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 4, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) uno de los siguientes genes de polisacárido capsular regulados hacia niveles menores de expresión en comparación con la(s) cepa(s) nativa(s) a partir de las que se derivan: ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, synA, synB, synC o siaD
6. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 5, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) uno de dichos genes de polisacárido capsular suprimido.
- 20 7. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de las reivindicaciones 5 o 6, en la que están presentes ambas vesículas de la membrana externa L2 y L3, que se derivan de cepas que tienen el mismo gen de polisacárido capsular regulado hacia niveles menores de expresión en cada cepa.
8. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de las reivindicaciones 1-7, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) cualquier o ambos de los siguientes genes de lípido A regulado hacia niveles menores de expresión en comparación con la(s) cepa(s) nativa(s) a partir de las que se derivan: msbB o htrB.
- 25 9. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 8, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) msbB regulado hacia niveles menores de expresión.
10. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 8 o 9, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) cualquier o ambos de los genes de lípido A suprimidos.
- 30 11. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de las reivindicaciones 8-10, en la que están presentes ambas vesículas de la membrana externa L2 y L3, que se derivan de cepas que tienen el(los) mismo(s) gen(es) de lípido A regulado(s) hacia niveles menores de expresión en cada cepa.
- 35 12. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de las reivindicaciones 1-11, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) 1 o más de los siguientes genes de proteína de membrana externa regulados hacia niveles menores de expresión en comparación con la(s) cepa(s) nativa(s) a partir de las que se derivan: porA, porB, opA, opC, pilC o frpB.
13. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 12, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) uno o más de dichos genes de proteína de membrana externa suprimidos.
- 40 14. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 12 o 13, en la que están presentes ambas vesículas de la membrana externa L2 y L3, que se derivan de cepas que tienen el(los) mismo(s) gen(es) de proteína de membrana externa regulado(s) hacia niveles menores de expresión en cada cepa.
- 45 15. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de las reivindicaciones 12-14, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) cualquiera de las combinaciones siguientes de genes de proteína de membrana externa regulados hacia niveles menores de expresión en comparación con la(s) cepa(s) nativa(s) a partir de las que se derivan: PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, PorA y OpA y OpC, PorA y FrpB, OpC y FrpB, OpA y FrpB, PorA y OpA y OpC y FrpB.
16. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 15, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) cualquiera de dichas combinaciones de genes de proteína de membrana externa suprimidas.
- 50 17. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de las reivindicaciones 1-16, en la que la(s) cepa(s) de *Neisseria* tiene(n) 1 o más de los siguientes antígenos de proteína de membrana externa regulados hacia niveles mayores de expresión: NspA, TbpA bajo, TbpA alto, Hsf, Hap, OMP85, PilQ, NadA, LbpA, MltA.

18. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 17, en la que están presentes ambas vesículas de la membrana externa L2 y L3, que se derivan de cepas que tienen uno o más antígenos de proteína de membrana externa diferentes regulados hacia niveles mayores de expresión en cada cepa.
- 5 19. Una preparación de LOS aislada a partir de una(s) cepa(s) de *Neisseria* a partir de la(s) que se derivan las preparaciones de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, y que comprende inmunotipo LOS L2 y/o L3.
20. La preparación de LOS de la reivindicación 19 en una formulación de liposomas.
- 10 21. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 o la preparación de LOS de la reivindicación 19 o 20, en la que el LOS contenido en la misma se conjuga con una fuente de epítomos de células T colaboradoras.
22. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 21, en la que la fuente de epítomos de células T colaboradoras es una proteína o proteína de membrana externa.
23. La preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 22, que es obtenible mediante un procedimiento de reticulación intra-vesícula de la membrana externa.
- 15 24. Una composición o vacuna inmunogénica que comprende la preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* o la preparación de LOS de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
25. La vacuna de la reivindicación 24, que comprende adicionalmente un adyuvante.
- 20 26. La vacuna de la reivindicación 25, en la que el adyuvante es hidróxido de aluminio, o 3D-MPL y fosfato de aluminio.
27. La vacuna de la reivindicaciones 24-26 que comprende adicionalmente uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares conjugados derivados de las cepas siguientes: meningococo serogrupo A, meningococo serogrupo C, meningococo serogrupo W-135, meningococo serogrupo Y, y *H. influenzae* tipo b.
- 25 28. Un procedimiento de fabricación de vacuna de preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de la reivindicación 24, que comprende las etapas de cultivar la(s) cepa(s) de *Neisseria* a partir de la(s) que se derivan las preparaciones de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, aislar las vesículas de la membrana externa de las mismas, y formular las vesículas de la membrana externa con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que la etapa de aislamiento se lleva a cabo mediante extracción con 0-0,5, 0,02-0,4, 0,04-0,3, 0,06-0,2 o 0,08-0,15 % de desoxicolato.
- 30 30. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que la etapa de aislamiento se lleva a cabo mediante extracción con aproximada o exactamente 0,1 % de desoxicolato.
- 35 31. Una vacuna de preparación de vesículas de la membrana externa de *Neisseria* preparada mediante el procedimiento de las reivindicaciones 28-30.

Figura 1: Inmunotipos L3 y L2 (cepas H44/76, Mc58)

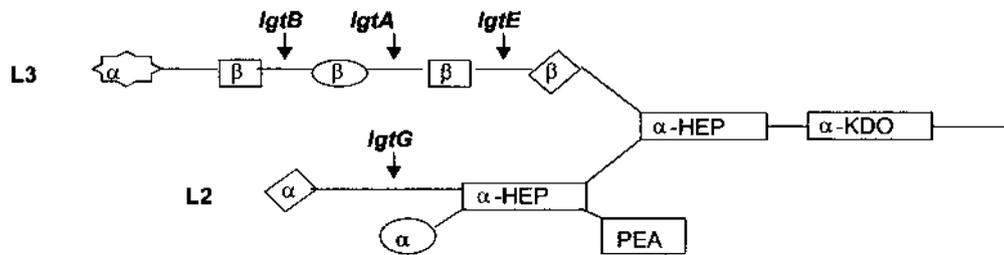
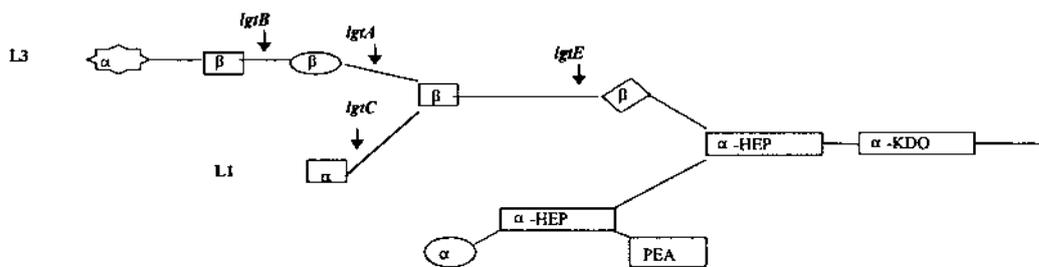


Figura 2: Inmunotipos L3 y L1 (por ejemplo, cepa 126E)



α ácido siálico

β glucosa

β galactosa

α acetilglucosamina

PEA fosfoetanolamina

Figura 3A

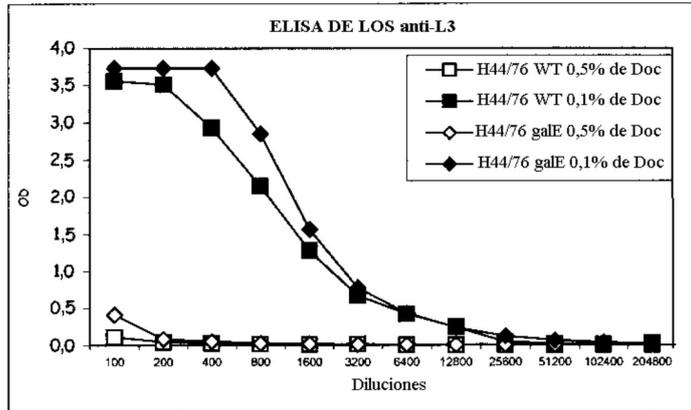


Figura 3B

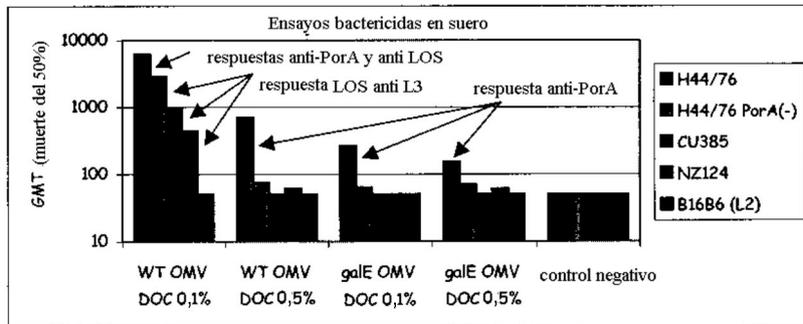


Figura 3C

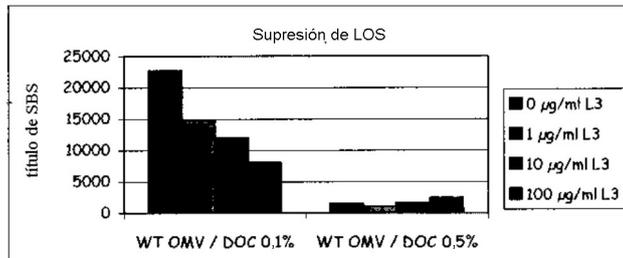


Figura 4

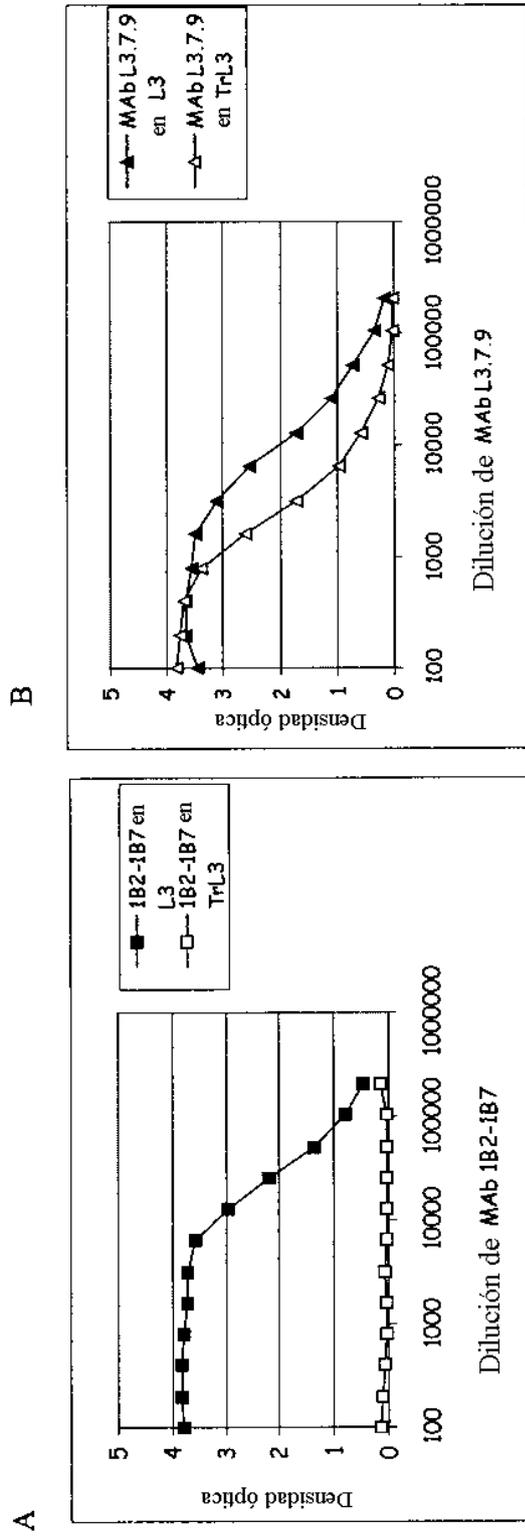


Figura 5 A

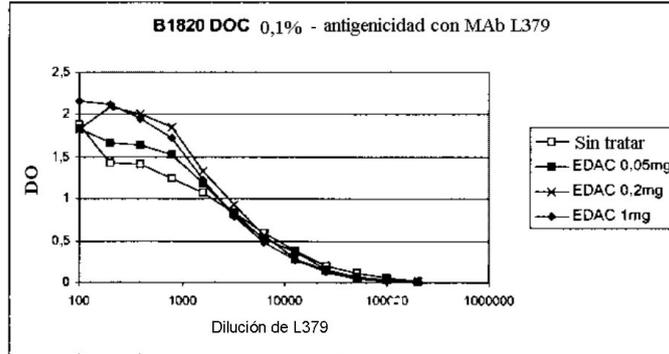


Figura 5 B

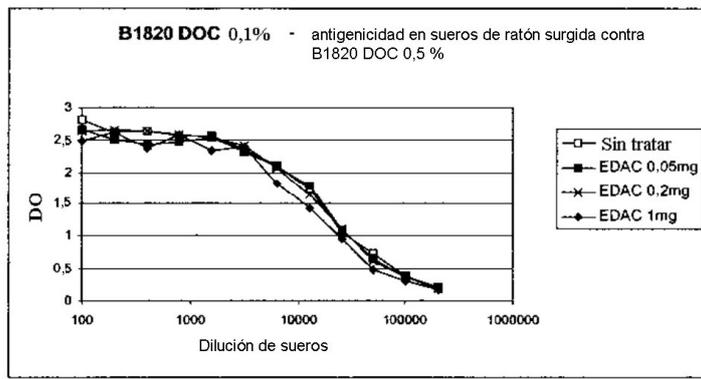


Figura 5 C

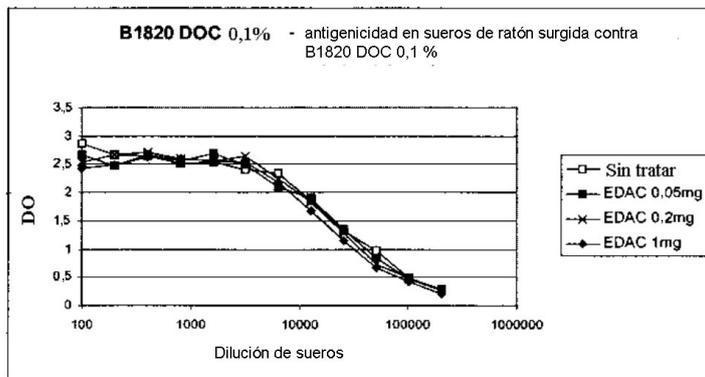


Figura 6A

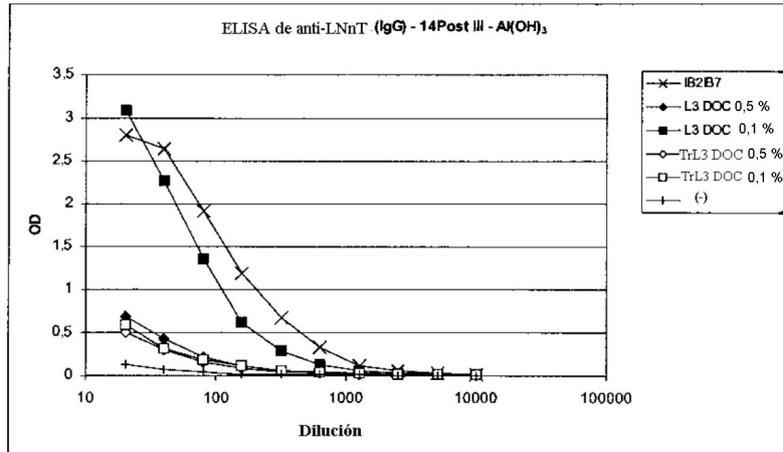


Figura 6B

