

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 650**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2000 E 10178238 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2270172**

54 Título: **Composiciones de combinaciones de Neisseria**

30 Prioridad:

19.05.1999 GB 9911692

19.08.1999 GB 9919705

09.03.2000 GB 0005730

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

15.03.2016

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

GIULIANI, MARZIA MONICA;
PIZZA, MARIAGRAZIA y
RAPPUOLI, RINO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 563 650 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 combinaciones de *Neisseria*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden combinaciones de moléculas biológicas de bacterias del género *Neisseria*, particularmente de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.

Técnica anterior

Neisseria meningitidis y *Neisseria gonorrhoeae* son diplococos no móviles Gram negativos que son patógenos en seres humanos.

10 Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado 12 serogrupos de *N. meningitidis*. El grupo A es el patógeno más frecuentemente implicado en epizootias en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la inmensa mayoría de casos en los Estados Unidos y en los países más desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en los Estados Unidos y en los países desarrollados.

15 La vacuna meningocócica actualmente en uso es una vacuna polisacáridica tetravalente compuesta por los serogrupos A, C, Y y W135. Sin embargo, el meningococo B continúa siendo un problema. La estrategia con polisacáridos no puede utilizarse porque el polisacárido capsular menB es un polímero de ácido *N*-acetil neuramínico con enlaces $\alpha(2-8)$ que también está presente en tejidos de mamíferos. Otra estrategia para una vacuna de menB utiliza mezclas de proteínas de membrana externa (OMP, *outer membrane proteins*). Para salvar la variabilidad antigénica, se han construido vacunas multivalentes que contienen hasta nueve porinas diferentes [por ejemplo Poolman JT (1992) Development of a meningococcal vaccine. Infect. Agents Dis. 4: 13-28]. Otras proteínas que se
20 utilizan en vacunas preparadas con proteínas de membrana externa han sido las proteínas opa y opc, pero ninguna de estas estrategias ha podido salvar la variabilidad antigénica [por ejemplo, Ala'Aldeen & Borriello (1996) The meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains. Vaccine 14(1): 49-53].

25 Dada la predisposición a presentar enfermedad meningocócica durante periodos no epidémicos, causada por cepas o variantes de cepas múltiples [Russel y col. (1998) Abstracts of 11^a International pathogenic *Neisseria* conference, página 281] junto con cambios temporales frecuentes en las cepas predominantes en una comunidad, parece que una vacuna meningocócica B universal requerirá más de una especie antigénica.

Descripción de la invención

En los siguientes documentos se desvelan secuencias de nucleótidos y proteínas de *Neisseria*:

- 30
- WO 99/24578
 - WO 99/36544
 - WO 99/57280
 - WO 97/28273
 - WO 96/29412

35

 - WO 95/03413
 - Tettelin y col. (2000) Science 287: 1809-1815

Para facilitar las referencias, en la presente solicitud se hace referencia a las secuencias desveladas en estos documentos de acuerdo con la siguiente tabla:

Documento	Numeración de secuencia original	Numeración de secuencia en esta solicitud
WO 99/24578	SEC ID 1-892	SEC ID 1-892
WO 99/36544	SEC ID 1-90	SEC ID 893-982
WO 99/57280	SEC ID 1-3020	SEC ID 983-4002
WO 97/28273	Figura 4 ADN codificante Figura 4 proteína Figura 9 ADN codificante Figura 13 ADN Figure 13 proteína	SEC ID 4003 SEC ID 4004 SEC ID 4005 SEC ID 4006 SEC ID 4007
WO 96/29412	SEC ID 1-26	SEC ID 4008-4033
WO 95/03413	SEC ID 1-23	SEC ID 4034-4056
Tettelin et al. (2000) Science 287: 1809-15	NMB0001-2160 (ADN) NMB0001-2160 (proteínas codificadas)	SEC ID 4057-6216 SEC ID 6217-8376

La presente invención proporciona composiciones que comprenden dos o más proteínas de *Neisseria* diferentes, en el que dos o más proteínas de *Neisseria* diferentes incluyen una primera proteína de una bacteria de *Neisseria* y una segunda proteína de una bacteria de *Neisseria*.

5 En una realización preferida, la primera y segunda proteínas son de diferentes especies de *Neisseria* (por ejemplo, una es de *N. meningitidis* y la otra es de *N. gonorrhoeae*), pero estas pueden ser de la misma especie. En las composiciones, las proteínas pueden ser diferentes serogrupos o cepas de la misma especie.

La primera proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2182; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N°: 2182; en la que la segunda proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N° 1-2181 y 2183-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2181 y 2183-4002. La primera proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2184; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N° 2184; en la que la segunda proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2183 y 2185-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2183 y 2185-4002. La primera proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2186; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N°: 2186; en la que la segunda proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionadas de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2185 y 2187-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2185 y 2187-4002. Estas proteínas son, preferentemente, proteínas purificadas o aisladas.

En particular, la invención proporciona una composición que comprende uno o más de los siguientes pares de primera y segunda proteínas que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas a continuación (indicadas por SEC ID):

Primera	Segunda
2182	1-2181 y 2183-4002
2184	1-2183 y 2185-4002
2186	1-2185 y 2187-4002

25 La divulgación incluye cada uno de los 35074500 posibles pares de las SEC ID 1-8376 (1 y 2, 1 y 3, 1 y 4, 1 y 5 ... 1 y 8375, 1 y 8376, 2 y 3, 2 y 4, 2 y 5 ... 2 y 8375, 2 y 8376, 3 y 4 ... 1000 y 1001, 1000 y 1002 ... 1000 y 8376 ... 8374 y 8375, 8374 y 8376, 8375 y 8376) aunque, por razones de espacio, no se indican en su totalidad en el presente documento.

30 Los detalles sobre cómo se pueden producir y utilizar las moléculas que constituyen las SEC ID 1-4056 se pueden encontrar en solicitudes internacionales relevantes y no es preciso repetir esos detalles en el presente documento. Se aplican principios similares a las SEC ID 4057-8376.

35 En las composiciones de la invención, las SEC ID de acuerdo con las reivindicaciones, pueden complementarse o sustituirse con moléculas que comprenden secuencias homólogas (es decir, que tienen identidad de secuencia) a las SEC ID enumeradas en las reivindicaciones. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de identidad es preferentemente mayor del 80 % (por ejemplo, 90 % o más) e incluye mutantes y variantes alélicas. La identidad de secuencia entre las proteínas se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman implementado en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda de hueco afín con parámetros de penalización por apertura de hueco=12 y penalización por extensión de hueco=1.

40 Cuando la composición incluye una proteína que existe en formas naciente y madura diferentes, se utiliza preferentemente la forma madura de la proteína. Por ejemplo, puede utilizarse la forma madura de la proteína NspA (SEC ID 4008-4033; documento WO96/29412; Figura 29 del documento WO00/71725) que carece de péptido señal.

45 En determinadas realizaciones, la composición comprende proteínas de especies de *Neisseria* diferentes, tales como una o más proteínas de *N. meningitidis* y una o más proteínas de *N. gonorrhoeae*. En algunas realizaciones, la composición puede comprender proteínas de diferentes serogrupos y/o cepas de la misma especie, tales como las cepas A y B de *N. meningitidis*. Otras realizaciones comprenden mezclas de una o más proteínas de *N. meningitidis* de diferentes cepas y también una o más proteínas de *N. gonorrhoeae*.

Muchas proteínas están relativamente conservadas entre diferentes especies, serogrupos y cepas de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* (por ejemplo, SEC ID 52, 54, 58). El documento WO00/66741 incluye un análisis experimental más detallado de regiones conservadas en estas proteínas. Para garantizar un máximo reconocimiento y reactividad de cepas cruzadas, en las composiciones de la presente invención pueden utilizarse regiones de proteínas que están conservadas entre diferentes especies, serogrupos y cepas de *Neisseria*. Por lo tanto, la divulgación proporciona proteínas que comprenden tramos de secuencias de aminoácidos compartidos entre la mayoría de las *Neisseria*, particularmente *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Un aminoácido "conservado" es uno que está presente en una proteína de *Neisseria* particular en al menos x % de *Neisseria* (o, preferentemente, en al menos x % de cepas de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* combinadas). El valor de x puede ser 50 % o más, por ejemplo, 66 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 100 % (es decir, el aminoácido se encuentra en la proteína en cuestión en todas las *Neisseria*). Para determinar si un aminoácido está "conservado" en una proteína de *Neisseria* particular, es necesario comparar ese resto de aminoácido en las secuencias de la proteína en cuestión de una pluralidad de diferentes *Neisseria* (una "población de referencia"). En el documento WO00/66741 pueden encontrarse definiciones adecuadas de "poblaciones de referencia". Las secuencias de aminoácidos de diferentes *Neisseria* pueden compararse fácilmente utilizando ordenadores. Esto implicará típicamente el alineamiento de una serie de secuencias utilizando un algoritmo tal como CLUSTAL [Thompson et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680; *Trends Biochem Sci* (1998) 23:403-405] o, preferentemente, PILEUP [parte del paquete informático del GCG de Wisconsin, preferentemente la versión 9.0]. Los aminoácidos conservados pueden apreciarse fácilmente en un alineamiento de secuencias múltiple - en la posición del aminoácido en cuestión una gran cantidad de las secuencias alineadas contendrán un aminoácido particular. Los aminoácidos conservados pueden hacerse más apreciables visualmente utilizando un programa tal como BOXSHADE [disponible, por ejemplo, en el NIH por internet], PRETTYBOX [GCG Wisconsin, versión 10] o JALVIEW [disponible en internet en EBI].

Por lo tanto, las composiciones específicas de acuerdo con la invención incluyen las que comprenden:

- (i) una primera proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2182; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N°: 2182; y la segunda proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2182 y 2183-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2181 y 2183-4002; o
- (ii) la primera proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2184; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N°: 2184; y la segunda proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2183 y 2185-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2183 y 2185-4002; o
- (iii) la primera proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2186; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N°: 2186; y la segunda proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2185 y 2187-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2185 y 2187-4002; cualquiera de los puntos (i), (ii) o (iii) anteriores que comprenden dos o más proteínas purificadas seleccionadas de las SEC ID 1-4002 pares;

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra datos FACS de antígenos individuales y de las combinaciones que se utilizan en el Ejemplo 2.

Ejemplos

Ejemplo 1 - mezcla trivalente

Las proteínas ORF1 (por ejemplo, ejemplo 77 del documento WO99/24578; véase también el documento WO99/55873), '287' (por ejemplo Figura 21 del documento WO99/57280; también SEC ID 3103-3108 incluidas en el mismo) y '919' (por ejemplo, documento WO99/57280 Figura 23 y SEC ID 3069-3074 incluidas en el mismo) se combinaron y como adyuvante se incluyó Al(OH)₃. Las proteínas eran de la cepa 2996 de MenB.

Esta mezcla también se combinó con un antígeno conjugado de polisacárido MenC [por ejemplo Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10: 691-698]. Como control se utilizaron las proteínas de membrana externa (OMV).

La mezcla se utilizó en un ensayo bactericida contra la cepa homóloga y también las cepas heterólogas de MenB. Los títulos fueron estos:

	2996	BZ133	BZ232	1000	MC58	NGH38
Trivalente	2048	2048	4	<4	64	4
+MenC	2048	>32000	4	128	1024	128
Control	32765	4096	8192	16384	16384	8192

Ejemplo 2 – Proteínas 287, 919 y 953

Las proteínas 287, 919 y 953 se desvelan en el documento WO99/57280. Estas proteínas de la cepa 2996 del serogrupo B de *N. meningitidis* se expresaron y analizaron en un ensayo bactericida contra la cepa 2996, sola y en combinaciones. Como control positivo se utilizaron las OMV de 2996.

Antígeno	287	919	953	Control
Título	8192	2048	128	65536
Combinación	287+919	287+953	919+953	287+919+953
Título	32000	8192	8192	8192

5

La Figura 1 muestra datos FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*, separación de células activadas por fluorescencia) de los antígenos individuales y de las cuatro combinaciones.

Es obvio que las mezclas de antígeno sean más eficaces que los antígenos en aislamiento y, en particular, que las combinaciones de 919+953 den resultados sorprendentemente buenos.

10 Los antígenos individuales de 2996 y combinaciones también se analizaron frente a diferentes cepas de serogrupo A, B y C (es decir, exposición heteróloga). Los títulos bactericidas fueron estos:

Antígeno	Cepas de serogrupo B (MenB)					MenA	MenC
	2996	BZ133	BZ232	MC58	NGH38	F6124	C11
287	8192	>4096	256	1024	2048	1024	2048
919	2048	-	1024	-	-	-	-
953	128	-	-	-	-	-	-
287+919	32000	>4096	512	512	1024	512	>2048
287+953	8192	>4096	1024	512	2048	2048	>2048
919+953	8192	-	8192	-	-	-	-
Trivalente	8192	>2048	256	-	1024	>2048	>2048
Control	65536	-	8192	2048	-	2048	32768

Es obvio que las mezclas de antígeno son útiles confiriendo actividad cruzada entre cepas.

En un segundo conjunto de experimentos, los títulos de los antígenos individuales fueron estos:

Antígeno	Cepas de serogrupo B (MenB)					MenA	MenC
	2996	BZ133	BZ232	MC58	NGH38	F6124	C11
287	16000	2048	16	512	>2048	64	1024
919	16000	-	2048	-	-	-	-
953	2048	-	16	-	-	-	-

15

Las tres proteínas utilizadas en este ejemplo se expresaron y se utilizaron de las siguientes formas:

- (1) la proteína 287 se expresó en *E. coli* como una fusión GST (glutatión-S-transferasa);
- (2) la proteína 919 se expresó en *E. coli* sin su péptido líder, sin su cisteína N-terminal madura, y sin ningún compañero de fusión ("919-sin etiqueta"); y
- (3) la proteína 953 se expresó utilizando una etiqueta de histidina.

20

Se administraron tres inmunizaciones con adyuvantes de Freund – la primera incluía CFA, y las dos últimas incluían IFA.

Ejemplo 3 - combinaciones polivalentes adicionales

Se analizaron combinaciones adicionales de antígenos en ratones CD1:

ES 2 563 650 T3

Antígenos *	Adyuvante	FACS	ELISA	Actividad Bactericida
919-his+Orf4-his+ 225-his+Orf40-his **	Freund	+++	+	8192
Orf4-L+Orf37-GST+Orf40-his+502-his+8-his **	Freund	+++	+	Bacteriostática
919-sin etiqueta+791-his+792-his **	Freund	+++	+	4096
919-sin etiqueta+287-GST+953-his	Freund	+++	+	8192
919-sin etiqueta+287-GST	Freund	+++	+	32000
287-GST+953-his	Freund	+++	+	8192
919-sin etiqueta+953-his **	Freund	+++	+	8192
919-sin etiqueta+Orf1-his+287-GST	Al(OH) ₃	+++	+	2048
919-sin etiqueta+Orf1-his+287-GST+ glucoconj. MenC	Al(OH) ₃	+++	+	2048
Orf-46.1-his+287-GST	Al(OH) ₃	n. d.	+	128
*: "his" indica expresión e inmunización con una proteína etiquetada con histidina; "ORF4-L" es la forma lipídica de la ORF4; "GST" indica expresión e inmunización con una proteína de fusión GST; "919-sin etiqueta" es como se define en el Ejemplo 2; "glucoconj MenC" es el glucoconjugado de MenC descrito en el Ejemplo 1. ** = para fines comparativos.				

Se analizaron combinaciones adicionales de antígenos en cobayas:

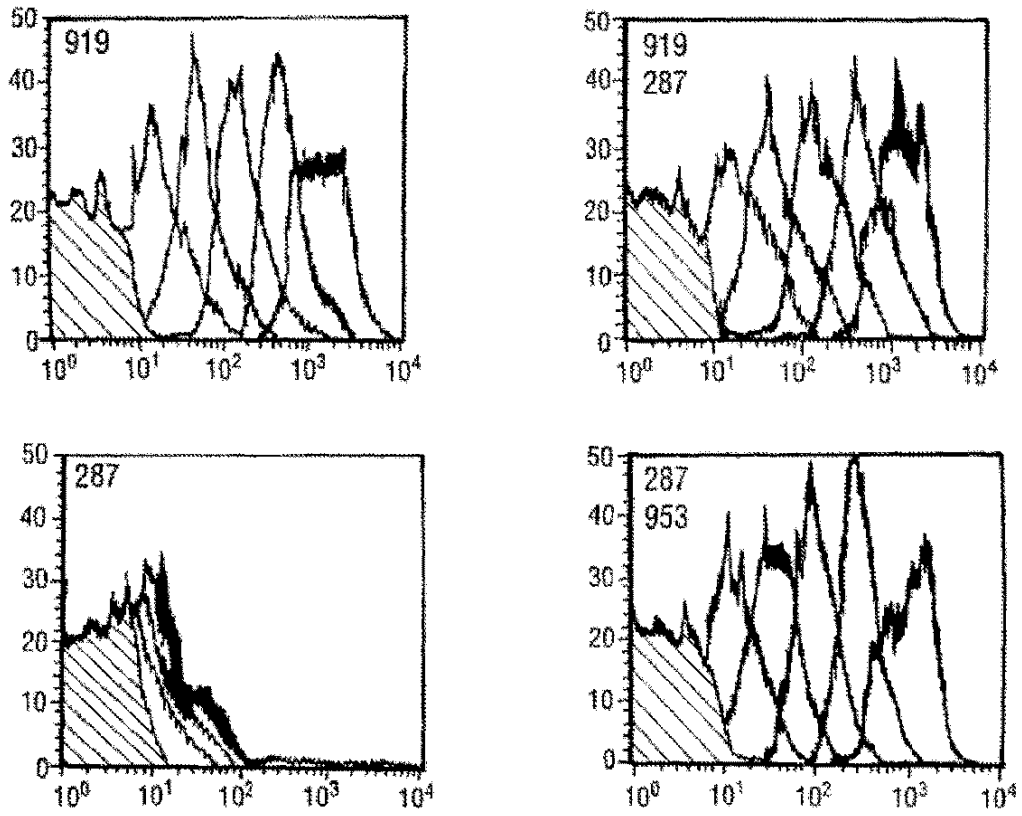
Antígenos *	Adyuvante	FACS	ELISA	Actividad Bactericida
919-his+287-GST+953-his+Orf46.1-his	Freund	+	+	4096
919-sin etiqueta + 287-GST + 953-his	Freund	+	+	4096
287-GST + 953-his	Al(OH) ₃	n.d.	+	256

Obviamente, las combinaciones dieron excelentes resultados inmunológicos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende dos o más proteínas de *Neisseria* diferentes, en la que las dos o más proteínas de *Neisseria* diferentes incluyen una primera proteína de una bacteria de *Neisseria* y una segunda proteína de una bacteria de *Neisseria*, y en la que
- 5 (i) la primera proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2182; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N°: 2182; y la segunda proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionada de las SEC ID N°: 1-2181 y 2183-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2181 y 2183-4002; o
- 10 (ii) la primera proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2184; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N°: 2184; y la segunda proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2183 y 2185-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2183 y 2185-4002; o
- 15 (iii) la primera proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) SEC ID N°: 2186; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con la SEC ID N°: 2186; y la segunda proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2185 y 2187-4002; (b) una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % con una de las SEC ID N° pares seleccionadas de las SEC ID N°: 1-2185 y 2187-4002.
- 20 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende dos o más proteínas purificadas seleccionadas de las SEC ID: 1-4002 pares.

FIGURA 1



cont.

FIGURA 1 (cont.)

