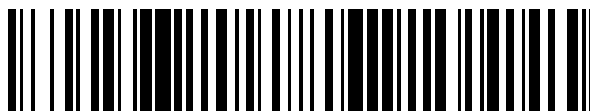


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 048**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2003 E 10181277 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2351579**

54 Título: **Vacunas polipeptídicas para protección amplia contra linajes meningocócicos hipervirulentos**

30 Prioridad:

11.10.2002 GB 0223741

13.03.2003 GB 0305831

22.04.2003 GB 0309115

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

05.04.2017

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)

Rue de l'Institut 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

PIZZA, MARIAGRAZIA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 608 048 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas polipeptídicas para protección amplia contra linajes meningocócicos hipervirulentos

Campo de la Invención

5 La presente invención pertenece a los campos de la inmunología y vacunología. En particular, se refiere a antígenos de *Neisseria meningitidis* (meningococos) y a su uso en inmunización.

Antecedentes de la Invención

10 La *N. meningitidis* es un patógeno humano Gram-negativo no móvil, que coloniza la faringe y que provoca meningitis (y, ocasionalmente, septicemia en ausencia de meningitis). Provoca enfermedad endémica y epidémica. Luego de la introducción de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae*, la *N. meningitidis* es la causa principal de meningitis bacteriana en los Estados Unidos.

15 Con base en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado diversos serogrupos de *N. meningitidis*. El serogrupo A es el patógeno más frecuentemente implicado en la enfermedad epidémica en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la gran mayoría de casos en los Estados Unidos y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en los Estados Unidos y en los países desarrollados. Después del serogrupo, la clasificación incluye serotipo, serosubtipo y luego inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera el serogrupo, serotipo, serosubtipo, e inmunotipo, cada uno separado por dos puntos, por ejemplo, B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes a menudo provocan enfermedad (hiperinvasora), algunos linajes provocan formas más severas de la enfermedad que otros (hipervirulenta) y otros raramente provocan enfermedad en absoluto. Se reconocen diversos linajes hipervirulentos, a saber los subgrupos I, 20 III y VI el complejo ET-5, el complejo ET-37, una agrupación A4 y el linaje 3. Estos se han definido por electroforesis enzimática de múltiples locus (MLEE), pero también se ha utilizado la tipificación de secuencia por múltiples locus (MLST) para clasificar meningococos [referencia 1].

25 Se ha conocido durante muchos años una vacuna de polisacáridos contra los serogrupos A, C, W135 e Y [2, 3] pero ha resultado difícil de alcanzar una vacuna contra el serogrupo B. Se han probado vacunas con base en vesículas de la membrana externa [por ejemplo, véase la referencia 4], pero la protección proporcionada por estas vacunas normalmente se restringe a la cepa utilizada para elaborar la vacuna. Por lo tanto, subsiste la necesidad de una vacuna del serogrupo B ampliamente efectiva.

30 Se han reportado secuencias genómicas para los serogrupos A [5] y B [6, 7] de los meningococos, y se ha estudiado la secuencia del serogrupo B para identificar antígenos de vacuna [por ejemplo referencias 8 a 13]. Se han manipulado antígenos candidatos para mejorar la expresión heteróloga [referencias 14 a 16].

Un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones adicionales y mejoradas para proporcionar inmunidad contra enfermedad y/o infección meningocócica, y en particular proporcionar amplia inmunidad contra meningococos del serogrupo B.

Divulgación de la Invención

35 Las vacunas contra patógenos tales como el virus de hepatitis B, difteria y tétanos normalmente contienen un antígeno de proteína simple (por ejemplo, el antígeno de superficie de HBV, o un toxoide tetánico). En contraste, las vacunas acelulares contra la tos ferina normalmente contienen por lo menos tres proteínas de *B. pertussis* y la vacuna neumocócica Prevenar™ contiene siete antígenos de sacáridos conjugados, separados. Otras vacunas tales como vacunas celulares de tos ferina, vacuna contra el sarampión, vacuna inactivada contra la polio (IPV) y vacunas 40 OMV meningocócicas son, por su naturaleza, mezclas complejas de una gran cantidad de antígenos.

45 Si se puede obtener protección por un antígeno único, un número pequeño de antígenos definidos, o una mezcla compleja de antígenos no definidos, depende por lo tanto del patógeno en cuestión. La invención se basa en el descubrimiento de que un pequeño número de antígenos definidos es capaz de proporcionar protección amplia contra la infección por meningococos, y la invención proporciona una composición la cual, después de administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo en ese sujeto, en el que la respuesta de anticuerpo es bactericida contra dos o más (por ejemplo 2 o 3) de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3 del serogrupo B de *N. meningitidis*.

50 En lugar de consistir en un antígeno único, se prefiere que la composición de la invención comprenda una mezcla de 10 o menos (por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados, y se prefiere particularmente que la composición no deba incluir mezclas complejas o indefinidas de antígenos, por ejemplo, se prefiere no incluir vesículas de la membrana externa en la composición.

Se ha encontrado que para los meningococos serogrupo B, una mezcla de cinco antígenos de proteína definidos promueve una buena respuesta inmunitaria protectora. La invención proporciona de este modo una composición como se define en la reivindicación 1 que comprende los siguientes cinco antígenos de proteína de meningococos: (1) una proteína "NadA"; (2) una proteína '741'; (3) una proteína '936'; (4) una proteína '953'; y (5) una proteína '287'.
 5 Estos antígenos son denominados aquí como los "cinco antígenos básicos".

Proteína NadA

Se describe la 'NadA' (adhesina A de Neisseria) del serogrupo B de *N. meningitidis* como la proteína "961" en la referencia 10 (SEQ ID NOS: 2943 y 2944) y como "NMB1994" en la referencia 6 (véanse también números de acceso GenBank: 11352904 y 7227256). Se puede encontrar una descripción detallada de la proteína en la referencia 17. No existe proteína correspondiente en el serogrupo A [5, 17].
 10

Cuando se utiliza de acuerdo con la presente invención, la NadA es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

La NadA puede tomar diversas formas que incluyen las variantes de truncamiento o supresión, tales como aquellas descritas en las referencias 14 a 16. En particular, se prefiere la NadA sin su ancla de membrana C terminal (por ejemplo supresión de los residuos 351 a 405 para la cepa 2996 [SEQ ID NO: 1], que algunas veces se distingue aquí por el uso de un superíndice 'C', por ejemplo NadA^(C). La expresión de NadA sin su dominio de ancla de membrana (por ejemplo SEQ ID NO: 1) en *E. coli* resulta en la secreción de la proteína en el sobrenadante de cultivo con la eliminación concomitante de su péptido líder 23 mer (por ejemplo para dejar 327 mer para la cepa 2996 [SEQ ID NO: 2]). Los polipéptidos sin sus péptidos líder algunas veces se distinguen aquí por el uso del superíndice 'NL', por ejemplo NadA^(NL) o NadA^{(C)(NL)}.
 15
 20

Las formas alélicas de NadA se muestran en la Figura 9 de la referencia 18.

Cuando se suprimen los residuos N terminales, se prefiere que la supresión no deba eliminar la habilidad de la NadA para adherirse a las células epiteliales humanas. Un fragmento preferido de la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 2.

Se puede preparar convenientemente la NadA secretada en forma altamente pura a partir del sobrenadante del cultivo mediante un procedimiento que comprende las etapas de: concentración y diafiltración contra un regulador mediante ultrafiltración; cromatografía de columna aniónica; cromatografía de columna hidrófoba; cromatografía en columna de cerámica de hidroxilapatita; diafiltración contra un regulador; y esterilización por filtración. Los detalles adicionales del procedimiento se dan en los ejemplos.
 25

Preferiblemente se utiliza la NadA en una forma oligomérica (por ejemplo en forma trimérica).

30 Proteína 741

Se divulga la proteína '741' del serogrupo B en la referencia 10 (SEQ ID NOS: 2535 y 2536) y como "NBMB1870" en la referencia 6 (véase también número de acceso GenBank GI: 7227128). La proteína correspondiente en el serogrupo A [5] tiene número de acceso GenBank 7379322. La 741 es naturalmente una lipoproteína.

Cuando se utiliza de acuerdo con la presente invención, la proteína 741 tiene $\geq 85\%$ de identidad a la SEQ ID NO: 3.

La proteína 741 puede tomar varias formas que incluyen variantes de truncamiento o supresión, tales como aquellas divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede suprimir el terminal N de 741 hasta e incluyendo su secuencia de poliglicina (es decir supresión de los residuos 1 a 72 para la cepa MC58 [SEQ ID NO: 3]), que algunas veces se distingue aquí por el uso de un prefijo 'ΔG'. Esta supresión puede potenciar la expresión. La supresión también elimina el sitio de lipidación de 741.
 35

Las secuencias 741 preferidas tienen 90% o más de identidad (por ejemplo 95%, 99% o más) a la SEQ ID NO: 3. Esta incluye las variantes de 741 (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Se pueden encontrar las formas alélicas de 741 en las SEQ ID NOS: 1 a 22 de la referencia 16, y en la SEQ ID NO: 1 a 23 de la referencia 19. Las SEQ ID NOS: 1-299 de la referencia 20 dan 741 secuencias adicionales.
 40

La proteína 741 es un antígeno extremadamente efectivo para provocar respuestas de anticuerpo antimeningocócico, y se expresa a través de todos los serogrupos meningocócicos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos, y que uno de estos grupos se divide nuevamente para dar tres variantes en total [21], y mientras el suero producido contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo variante, no es activo contra las cepas que expresan una de las otras dos variantes, es decir, existe protección cruzada intravariante, pero no protección cruzada intervariantes. Por lo tanto, para la eficiencia de cepa cruzada máxima se prefiere que una composición incluya más de una variante de la proteína 741. Una secuencia de ejemplo
 45
 50

proveniente de cada variante se da en la SEQ ID NO: 10, 11, y 12 aquí, comenzando con un residuo de cisteína N terminal al cual se puede unir covalentemente un lípido en la forma de lipoproteína de 741.

- 5 Por lo tanto se prefiere que la composición incluya: (1) una primera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos $a\%$ de identidad de secuencia con la SEQ ID 10; y por lo menos una de: (2) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos $b\%$ de identidad de secuencia con la SEQ ID 11 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de por lo menos y aminoácidos contiguos de la SEQ ID 11; y (3) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos $c\%$ de identidad de secuencia con la SEQ ID 12 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de por lo menos z aminoácidos contiguos de la SEQ ID 12.
- 10 El valor de a es por lo menos 85 por ejemplo 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, o más. El valor de b es por lo menos 85 por ejemplo 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, o más. El valor de c es por lo menos 85 por ejemplo 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, o más. Los valores de a , b y c no se relacionan intrínsecamente entre sí.

- 15 El valor de y es por lo menos 7 por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de z es por lo menos 7 por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Los valores de x , y y z no se relacionan intrínsecamente entre sí.

- 20 Se prefiere que cualquier secuencia de aminoácidos de 741 dada no caiga en más de una de las categorías (1), (2) y (3). Cualquier secuencia de 741 dada de esta manera caerá en solo una de estas categorías (1), (2) y (3). Se este modo se prefiere que: la proteína (1) tenga menos de $i\%$ de identidad de secuencia con la proteína (2); proteína (1) tenga menos de $j\%$ de identidad de secuencia con la proteína (3); y proteína (2) tenga menos de $k\%$ de identidad de secuencia con la proteína (3). El valor de i es 60 o más (por ejemplo 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) y es como mucho a . El valor de j es 60 o más (por ejemplo 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) y es como mucho b . El valor de k es 60 o más (por ejemplo 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) y es como mucho c . Los valores de i , j y k no se relacionan intrínsecamente entre sí.

Proteína 936

- 30 Se divulga la proteína '936' del serogrupo B en la referencia 10 (SEQ IDs 2883 y 2884) y como 'NMB2091' en la referencia 6 (véase también número de acceso GenBank GI:7227353). El gen correspondiente en el serogrupo A [5] tiene número de acceso GenBank 7379093.

Quando se utiliza de acuerdo con la presente invención, la proteína 936 tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID NO: 4.

- 35 La proteína 936 puede tener diversas formas que incluyen variantes de truncamiento o supresión, tales como aquellas descritas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede suprimir el péptido líder N terminal de 936 (es decir supresión de los residuos 1 a 23 para la cepa MC58 [SEQ ID 4]) para dar 936^(NL).

Las secuencias de 936 preferidas tienen 90% o más de identidad (por ejemplo 95%, 99% o más) con la SEQ ID 4. Esto incluye variantes (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes etc.).

Proteína 953

- 40 Se divulga la proteína '953' del serogrupo B en la referencia 10 (SEQ IDs 2917 y 2918) y como 'NMB1030' en la referencia 6 (véase también número de acceso GenBank GI:7226269). La proteína correspondiente en el serogrupo A [5] tiene número de acceso GenBank 7380108.

Quando se utiliza de acuerdo con la presente invención, la proteína 953 tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID NO: 5.

- 45 La proteína 953 puede tener diversas formas. Las formas preferidas de 953 son variantes de truncamiento o supresión, tales como aquellas descritas en las referencias 14 a 16. En particular, el péptido líder N terminal de 953 se puede suprimir (es decir supresión de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58 [SEQ ID 5]) para dar 953^(NL).

- 50 Las secuencias de 953 preferidas tienen 90% o más de identidad (por ejemplo 95%, 99% o más) con la SEQ ID 5. Esto incluye las variantes de 953 (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Las formas alélicas de 953 se pueden ver en la Figura 19 de la referencia 12.

Proteína 287

Se divulga la proteína '287' del serogrupo B en la referencia 10 (SEQ IDs 3103 y 3104), como 'NMB2132' en la referencia 6, y como 'GNA2132' en la referencia 13 (véase también número de acceso GenBank GI:7227388). La proteína correspondiente en el serogrupo A [5] tiene número de acceso GenBank 7379057.

- 5 Cuando se utiliza de acuerdo con la presente invención, la proteína 287 tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID NO: 6.

La proteína 287 puede tener diversas formas que incluyen variantes de truncamiento o supresión, tales como aquellas descritas en las referencias 14 a 16. En particular, el terminal N de 287 se puede suprimir hasta e incluir su secuencia de poliglicina (es decir supresión de los residuos 1 a 24 para la cepa MC58 [SEQ ID 6]), que algunas veces se distingue aquí por el uso de un prefijo ' ΔG '. Esta supresión puede potenciar la expresión.

Las secuencias de 287 preferidas tienen 90% o más de identidad (por ejemplo 95%, 99% o más) con la SEQ ID 6. Esto incluye variantes de 287 (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Las formas alélicas de 287 se pueden ver en las Figuras 5 y 15 de la referencia 12, y en el ejemplo 13 y figura 21 de la referencia 10 (SEQ IDs 3179 a 3184).

15 Proteínas de fusión

Los cinco antígenos pueden estar presentes en la composición como cinco proteínas separadas, pero se prefiere que por lo menos se expresen dos de los antígenos como una cadena sencilla de polipéptidos (una proteína 'híbrida' [referencia 14 a 161] por ejemplo, de tal manera que cinco antígenos forman menos de cinco polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas principales: primero, una proteína que puede ser inestable o pobremente expresada por sí sola puede ser ayudada al agregar un socio híbrido adecuado que supera el problema; segundo, la fabricación comercial se simplifica, ya que solo se necesita emplear una expresión y purificación con el fin de producir dos proteínas útiles separadas.

Una proteína híbrida incluida en una composición de la invención puede comprender dos o más (por ejemplo 2, 3, 4 6 5) de los cinco antígenos básicos. Se prefieren los híbridos que consisten de dos de los cinco antígenos básicos.

- 25 Dentro de la combinación de cinco antígenos básicos, un antígeno puede estar presente en más de una proteína híbrida y/o como una proteína no híbrida. Sin embargo, se prefiere que esté presente un antígeno ya sea como un híbrido o como un no híbrido, pero no como ambos, aunque puede ser útil incluir la proteína 741 como un antígeno híbrido y un antígeno no híbrido (preferiblemente lipoproteína), particularmente cuando se utiliza más de una variante de 741.

- 30 Los híbridos de dos antígenos para uso en la invención comprenden: NadA y 741; NadA y 936; NadA y 953; NadA y 287; 741 y 936; 741 y 953; 741 y 287; 936 y 953; 936 y 287; 953 y 287. Los híbridos preferidos de dos antígenos comprenden: 741 y 936; 953 y 287.

Se pueden representar las proteínas híbridas por la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que: X es una secuencia de aminoácidos de uno de los cinco antígenos básicos; L es una secuencia de aminoácidos ligadora opcional; A es una secuencia de aminoácidos N terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos C terminal opcional; y n es 2, 3, 4 o 5.

Si una fracción -X- tiene una secuencia de péptido líder en su forma de tipo silvestre, esta se puede incluir u omitir en la proteína híbrida. En algunas realizaciones, los péptidos líder se suprimirán, excepto para aquel de la fracción -X- localizada en el terminal N de la proteína híbrida, es decir se conservará el péptido líder de X1, pero se omitirán los péptidos líder de $X_2 \dots X_n$. Esto es equivalente a suprimir todos los péptidos líder y a utilizar el péptido líder de X1, como la fracción -A-.

Para cada n pueden estar presentes ejemplos de [-X-L-], secuencia de aminoácidos ligadora -L- o ausente. Por ejemplo, cuando n=2 el híbrido puede ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, etc. Las secuencias de aminoácidos ligadoras -L- normalmente serán cortas (por ejemplo 20 o menos aminoácidos, por ejemplo 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos comprenden secuencias de péptidos cortas que facilitan clonar los ligadores de poliglicina (es decir que comprenden Gly_n donde n= 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), y marcadores de histidina (por ejemplo His_n donde n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos ligadoras, adecuadas, serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Un ligador útil es GSGGGG (SEQ ID NO: 9), con el dipéptido Gly-Ser que se forma de un sitio de restricción BamHI, ayudando de este modo a la clonación y manipulación, y el tetrapéptido $(\text{Gly})_4$ es un ligador de poliglicina típico. Si X_{n+1} es una proteína ΔG y L_n es un ligador de glicina, esto puede ser equivalente a X_{n+1} que no es una proteína ΔG y L_n está ausente.

5 -A- es una secuencia de aminoácidos N terminal opcional. Normalmente será corta (por ejemplo 40 o menos aminoácidos es decir 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo marcadores de histidina, es decir His_n donde n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos N terminales adecuadas serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Si X₁ carece de su propia metionina N terminal, -A- es preferiblemente un oligopéptido (por ejemplo con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos), que proporciona una metionina N terminal.

10 -B- es una secuencia de aminoácidos C terminal opcional. Normalmente será corta (por ejemplo 40 o menos aminoácidos es decir 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias de péptidos cortas que facilitan la donación o purificación (por ejemplo que comprenden marcadores de histidina, es decir His_n donde n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), o secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácidos C terminales adecuadas serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

15 Aún más preferiblemente, n es 2. Dos proteínas preferidas de este tipo son: X₁ es una 936 y X₂ es una 741; X₁ es una 287 y X₂ es un 953.

Dos proteínas híbridas particularmente preferidas de la invención son como sigue:

n	A	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	B	[SEQ ID]
2	MA	ΔG287	GSGGGG	953 ^(NL)	-	-	7
2	M	936 ^(NL)	GSGGGG	ΔG741	-	-	8

20 Se pueden utilizar estas dos proteínas en combinación con NadA (SEQ ID NO: 2).

Se puede preparar de forma conveniente el híbrido 936-AG741 en forma altamente pura a partir de expresión en *E. coli* mediante un procedimiento que comprende las etapas de: homogeneización; centrifugación; cromatografía de columna catiónica; cromatografía de columna aniónica, cromatografía de columna hidrófoba; diafiltración contra un regulador; y esterilización por filtración. Los detalles adicionales del procedimiento se dan en los ejemplos.

25 Se pueden preparar los polipéptidos de la invención mediante diversos medios (por ejemplo expresión recombinante, purificación a partir del cultivo celular, síntesis química (por lo menos en parte), etc.), y en diversas formas (por ejemplo nativa, fusiones, no glucosilada, lipidada, etc.). Preferiblemente se preparan en forma sustancialmente pura (es decir sustancialmente libres de otras proteínas de *N. meningitidis* o de célula anfitriona).

Cepas

30 Las proteínas preferidas de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos encontrada en el serogrupo B de *N. meningitidis*. Dentro el serogrupo B, las cepas preferidas son 2996, MC58, 95N477 y 394/98. La cepa 394/98 algunas veces se senomin aquí como 'NZ' ya que es una cepa de Nueva Zelanda.

La proteína 287 es preferiblemente de la cepa 2996 o, más preferiblemente, de la cepa 394/98.

35 La proteína 741 es preferiblemente de las cepas MC58, 2996, 394/98 o 95N477 del serogrupo B, o cepa 90/18311 del serogrupo C. Se prefiere más la cepa MC58.

Las proteínas 936 y 953 son preferiblemente de la cepa 2996. NadA es de la cepa 2996.

40 Se pueden indicar las cepas como un subíndice, por ejemplo 741_{MC58} es la proteína 741 de la cepa MC58. A menos que se indique lo contrario, las proteínas mencionadas aquí (por ejemplo, sin subíndice) son de la cepa 2996 de *N. meningitidis*, la cual se puede tomar como una cepa de 'referencia'. Sin embargo, se apreciará que la invención no está limitada en general por la cepa. Como se mencionó anteriormente, se pueden tomar las referencias generales a una proteína (por ejemplo '287', '919', etc.) para incluir aquella proteína de cualquier cepa. Esta normalmente tendrá identidad de secuencia para 2996 de 90% o más (por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más).

Cuando una composición incluye un antígeno de proteína particular (por ejemplo 741 o 287), la composición puede incluir ese antígeno en más de una forma variante, por ejemplo, la misma proteína, pero de más de una cepa. Estas proteínas se pueden incluir como proteínas en tándem o separadas.

- 5 Cuando se utilizan proteínas híbridas, los antígenos individuales dentro del híbrido (es decir, unidades estructurales de -X- individuales) pueden ser de una o más cepas. Donde $n=2$, por ejemplo, X_2 puede ser de la misma cepa que X_1 o de una cepa diferente. Donde $n=3$, las cepas pueden ser (i) $X_1=X_2=X_3$ (ii) $X_1=X_2 \neq X_3$ (iii) $X_1 \neq X_2 = X_3$ (iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ o (v) $X_1=X_3 \neq X_2$, etc.

Linajes hipervirulentos y respuestas de anticuerpo bactericidas

- 10 En general, las composiciones de la invención son capaces de inducir respuestas de anticuerpo bactericidas en suero después de ser administradas a un sujeto. Estas respuestas se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [por ejemplo nota final 14 de la referencia 13]. La actividad bactericida en suero (SBA) mide la muerte bacteriana mediada por el complemento, y se puede ensayar utilizando complemento de humano o de conejo bebé. Los estándares WHO requieren una vacuna para inducir por lo menos un aumento de 4 veces en SBA en más del 90% de los receptores.

- 15 En lugar de ofrecer protección estrecha, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas de anticuerpo bactericidas contra más de un linaje hipervirulento del serogrupo B. En particular, pueden inducir respuestas bactericidas contra dos o tres de los siguientes tres linajes hipervirulentos: (1) agrupación A4; (ii) complejo ET5; y (iii) linaje 3. Pueden inducir adicionalmente respuestas de anticuerpo bactericidas contra uno o más linajes hipervirulentos del subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o el complejo ET37, y contra otros linajes, por ejemplo linajes hiperinvasores.

- 20 Esto no necesariamente significa que la composición puede inducir anticuerpos bactericidas contra todas y cada una de las cepas de meningococos del serogrupo B dentro de estos linajes hipervirulentos, por ejemplo, más bien, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas de meningococos del serogrupo B, dentro de un linaje hipervirulento particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra por lo menos 50% (por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos preferidos de cepas incluirán cepas aisladas en por lo menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. El suero tiene preferiblemente un título bactericida de por lo menos 1024 (por ejemplo 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o mayor, preferiblemente por lo menos 2^{14}) es decir, el suero es capaz de matar por lo menos 50% de las bacterias de una cepa particular, cuando se diluye 1/1024, como se describe en la referencia 13.

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

- 35 Las cepas 961-5945 y G2136 son ambas cepas de referencia de *Neisseria* MLST [ids 638 y 1002 en la referencia 22]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (por ejemplo ATCC BAA- 335) y fue la cepa secuenciada en la referencia 6. Se ha utilizado y caracterizado ampliamente la cepa 44/76 (por ejemplo referencia 23) y es una de las cepas de referencia de *Neisseria* MLST [id 237 en la referencia 22; fila 32 de la Tabla 2 en la referencia 1]. La cepa 394/98 se aisló originalmente en Nueva Zelanda en 1998, y se han publicado diversos estudios que utilizan esta cepa (por ejemplo referencias 24 y 25). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia de MLST [id 409 en la referencia 22; fila 41 de la Tabla 2 en la referencia 1].

La composición puede inducir adicionalmente una respuesta bactericida contra la cepa LNP17592 del serogrupo W135 (W135:2a:P1.5, 2), del complejo ET-37. Esta es una cepa Haji aislada en Francia en 2000.

Anfitrión heterólogo

- 45 Mientras que puede tener lugar la expresión de las proteínas de la invención en *Neisseria*, preferiblemente se utiliza un anfitrión heterólogo. El anfitrión heterólogo puede ser procariótico (por ejemplo una bacteria) o eucariótico. Es preferiblemente *E. coli*, pero otros anfitriones adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*), levadura, etc.

- 50 De este modo, la invención proporciona una composición como se define en las reivindicaciones la cual, después de administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo en ese sujeto, en el que la respuesta de anticuerpo es bactericida contra dos o más (por ejemplo 2 o 3) de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3 del serogrupo B de *N. meningitidis*, y en el que los inmunógenos en la composición que da origen a la respuesta de

anticuerpo, se obtienen mediante expresión recombinante en un anfitrión no Neisseriano. De este modo, los inmunógenos en las composiciones de la invención son preferiblemente inmunógenos recombinantes. De este modo se pueden preferir las composiciones que no incluyen preparaciones de OMV.

Composiciones y medicamentos inmunogénicos

- 5 Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y son más preferiblemente composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser ya sea profilácticas (es decir para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas.

10 El pH de la composición está preferiblemente entre 6 y 8, preferiblemente aproximadamente 7. Se puede mantener el pH estable mediante el uso de un regulador. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere utilizar un regulador de histidina [26]. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los humanos.

15 Se pueden presentar las composiciones en viales, o se pueden presentar en jeringas llenas listas para uso. Las jeringas se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis simple de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis simple o dosis múltiples. Las composiciones inyectables usualmente serán soluciones o suspensiones líquidas. Alternativamente, se pueden presentar en forma sólida (por ejemplo liofilizadas) para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de inyección.

20 Las composiciones de la invención se pueden empacar en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiple. Para las formas de dosis múltiple, se prefieren los viales a las jeringas prellenadas. Los volúmenes de dosificación efectivos se pueden establecer rutinariamente, pero una dosis típica humana de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

Cuando se va a preparar una composición de la invención extemporáneamente antes del uso (por ejemplo cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un conjunto, el conjunto puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa llena y lista para uso y un vial, con los contenidos de la jeringa que se utilizan para reactivar los contenidos del vial antes de inyección.

- 25 La invención también proporciona una composición de la invención para uso como un medicamento. El medicamento es preferiblemente capaz de producir una respuesta inmunitaria en un mamífero (es decir es una composición inmunogénica) y es más preferiblemente una vacuna.

30 La invención también proporciona el uso de una composición de la invención en la fabricación de un medicamento para aumentar una respuesta inmunitaria en un mamífero. También se divulga el uso de una proteína 'NadA', una proteína '741', una proteína '936', una proteína '953', y una proteína '287' (y otros antígenos opcionales) en la fabricación de un medicamento para aumentar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El medicamento es preferiblemente una vacuna.

35 También se divulga un método para aumentar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de una composición de la invención. La respuesta inmunitaria es preferiblemente protectora y preferiblemente involucra anticuerpos. El método puede aumentar una respuesta de refuerzo.

40 El mamífero es preferiblemente un humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferiblemente un niño (por ejemplo un bebé que empieza a andar o un infante); cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferiblemente un adulto. Una vacuna destinada para niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

Estos usos y métodos son preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad provocada por una *Neisseria* (por ejemplo meningitis, septicemia, bacteriemia, gonorrea, etc.). se prefiere la prevención y/o tratamiento de la meningitis bacteriana o meningocócica.

45 Una manera de verificar la eficacia del tratamiento terapéutico involucra monitorizar infección por *Neisseria* después de administración de la composición de la invención. Una manera de verificar la eficacia del tratamiento profiláctico involucra monitorizar las respuestas inmunitarias contra los cinco antígenos básicos después de administración de la composición. Se puede determinar la inmunogenicidad de las composiciones de la invención al administrarlas a sujetos de prueba (por ejemplo niños de 12 a 16 meses de edad, o modelos animales [27]) y luego determinar los parámetros estándares, que incluyen los anticuerpos bactericidas en suero (SBA) y los títulos de ELISA (GMT) de IgG anti-cápsula, total y de alta avidéz. En general se determinarán estas respuestas inmunitarias alrededor de 4 semanas después de administración de la composición, y se compararán con los valores determinados antes de administración de la composición. Se prefiere un incremento en SBA de por lo menos 4 veces u 8 veces. Cuando se

administra más de una dosis de la composición, se puede realizar más de una determinación posterior a la administración.

5 Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpo en un paciente, que es superior al criterio para la seroprotección para cada componente de antígeno para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpo asociados anteriores cuyo anfitrión se considera seroconvertido contra el antígeno, son bien conocidos, y dichos títulos son publicados por organizaciones tales como WHO. Preferiblemente se seroconvierte más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos, más preferiblemente más del 90%, todavía más preferiblemente más del 93% y lo más preferiblemente 96 a 100%.

10 En general se administrarán las composiciones de la invención directamente a un paciente. El suministro directo puede ser logrado mediante inyección parenteral (por ejemplo por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, o en el espacio intersticial de un tejido), o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración por mucosa. Se prefiere administración intramuscular en el muslo o en la parte superior del brazo. La invención puede ser por medio de una aguja (por ejemplo una aguja hipodérmica), pero se puede utilizar alternativamente inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

15 Se puede utilizar la invención para provocar inmunidad sistémica y/o por mucosa.

20 El tratamiento de dosis puede ser un esquema de dosis simple o un esquema de dosis múltiples. Se pueden utilizar dosis múltiples en un esquema de inmunización primaria y/o en un esquema de inmunización de refuerzo. Un esquema de dosis primario puede ser seguido por un esquema de dosis de refuerzo. Se puede determinar rutinariamente la sincronización adecuada entre las dosis de carga (por ejemplo entre 4-16 semanas), y entre dosis de carga y refuerzo.

25 Las infecciones por *Neisseria* afectan diversas áreas del cuerpo y por consiguiente se pueden preparar las composiciones de la invención en diversas formas. Por ejemplo, se pueden preparar las composiciones como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de inyección (por ejemplo una composición liofilizada). Se puede preparar la composición para administración tópica, por ejemplo como un ungüento, crema o polvo. La composición se va a preparar para administración oral, por ejemplo como un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente saborizado). Se puede preparar la composición para administración pulmonar, por ejemplo como un inhalador, utilizando un polvo fino o una pulverización. Se puede preparar la composición como un supositorio o pesario. Se puede preparar la composición para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo como pulverizaciones, gotas, gel o polvo [por ejemplo referencias 28 y 29]. Se ha reportado éxito con la administración nasal de los sacáridos neumocócicos [30, 31], polipéptidos neumocócicos [32], sacáridos Hib [33], sacáridos MenC [34], y mezclas de conjugados sacáridos Hib y MenC [35].

35 Las composiciones inmunogénicas utilizadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de antígenos, así como cualesquiera otros componentes, como sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente efectiva" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis simple o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que se va a tratar, edad, grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseada, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico acerca de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caerá en un rango relativamente alto que se puede determinar a través de ensayos de rutina, y una cantidad típica de cada antígeno de sacárido de meningococo por dosis, está entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, o aproximadamente 10 µg (expresado como sacárido).

45 **Componentes no antigénicos adicionales de la composición**

La composición de la invención, normalmente, además de los componentes anteriormente mencionados, comprenderá uno o más "portadores farmacéuticamente aceptables" los cuales incluyen cualquier portador que por sí mismo no induce la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son normalmente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosas [36], trehalosa [37], lactosa, y agregados de lípidos (tales como gotitas o liposomas). Dichos portadores son bien conocidos por aquellos con experiencia común en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, sustancias reguladoras de pH, y similares. La solución salina fisiológica estéril, libre de pirógenos, regulada con fosfato, es un portador típico. Una discusión exhaustiva de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 38.

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se empaqueta en el formato de dosis múltiples.

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

- 5 Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo cloruro de sodio) para dar tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de cloruro de sodio es típica.

Las composiciones de la invención incluirán en general un regulador. Es típico un regulador de fosfato.

- 10 Las composiciones de la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo manitol) o un disacárido (por ejemplo sacarosa o trehalosa) por ejemplo alrededor de 15 a 30 mg/ml (por ejemplo 25 mg/ml), particularmente si estas van a ser liofilizadas o si incluyen material que ha sido reconstituido del material liofilizado. El pH de una composición para la liofilización se puede ajustar alrededor de 6,1 antes de la liofilización.

Se pueden administrar las vacunas de la invención en conjunto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán usualmente un adyuvante. Los adyuvantes que se pueden utilizar en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

15 **A. Composiciones que contienen minerales**

- Las composiciones que contienen minerales, adecuadas para uso como adyuvantes en la invención, incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo véase Capítulos 8 y 9 de la referencia 391, o mezclas de diferentes compuestos minerales, con los compuestos que toman cualquier forma adecuada (por ejemplo gel, cristalina, amorfa, etc.), y con la adsorción que es la preferida. También se pueden formular composiciones que contienen minerales como una partícula de sal de metal [40].
- 20

- Se prefieren particularmente fosfatos de aluminio, particularmente en composiciones que incluyen un antígeno de sacárido de H. influenzae, y un adyuvante típico es al hidroxifosfato de aluminio amorfo con relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al^{3+} /ml. Se puede utilizar adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo, entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis. Cuando existe más de un conjugado en una composición, no todos los conjugados necesitan ser adsorbidos.
- 25

B. Emulsiones en Aceite

- Las composiciones de emulsión en aceite adecuadas para uso como adyuvantes en la invención, incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [Capítulo 10 de la referencia 39; véase también referencia 41] (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formulados en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador). También se pueden utilizar adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).
- 30

C. Formulaciones con saponina [Capítulo 22 de la referencia 39]

- También se pueden utilizar las formulaciones con saponina como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de estero1 y glucósidos de triterpenoide que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de un amplio rango de especies vegetales. Se ha utilizado ampliamente la saponina proveniente de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina como adyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officianalis* (raíz d jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOMs. El QS21 es comercializada como Stimulon™.
- 35
- 40

Se han purificado las composiciones de saponina utilizando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado las fracciones purificadas específicas utilizando estas técnicas, que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se describe en la referencia 42. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un estero1, tal como colesterol [43].

- 45 Se pueden utilizar las combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas individuales llamadas complejos inmunoestimuladores (ISCOMs) [Capítulo 23 de la referencia 391. Los ISCOM también incluyen normalmente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina O fosfatidilcolina. Se puede utilizar cualquier saponina conocida en ISCOMs. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM adicionalmente se describen en las referencias 43 a 45. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [46].
- 50

Se puede encontrar una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en las referencias 47 y 48.

D. Virosomas y partículas similares a virus

También se pueden utilizar virosomas y partículas similares a virus (VLPs) como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen en general una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Estos son en general no patógenos, no replicantes y en general no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales se pueden producir recombinantemente o aislar de virus enteros. Estas proteínas virales, adecuadas para uso en virosomas o VLPs, incluyen proteínas derivadas del virus de la influenza (tal como HA o NA), virus de la hepatitis B (tal como las proteínas de núcleo o de cápside), virus de hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de enfermedad Pie y Boca, retrovirus, virus Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, ARN-fagos, fago Q β (tal como proteínas de recubrimiento), fago GA, fago fr, fago AP205, y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se discuten adicionalmente en las referencias 49 a 54. Los virosomas se discuten adicionalmente en, por ejemplo, la referencia 55.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados de lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de los mismos.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil-lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de lípido A monofosforil 3-des-O-acilado, con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida del lípido A monofosforil 3-O-desacilado, se divulga en la referencia 56. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para ser esterilizadas por filtración a través de una membrana de 0,22 μ m [56]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen lípido A monofosforil, miméticos, tales como derivados de fosfato de aminoalquil-glucosamidina por ejemplo RC-529 [57, 58].

Los derivados del lípido A incluyen derivados del Lípido A provenientes de *Escherichia coli* tales como OM-174. El OM-174 se describe por ejemplo en las referencias 59 y 60.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo de CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace de fosfato a una guanosina). Los ARN de doble hebra y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG), también se han mostrado como inmunoestimuladores.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble hebra o de hebra sencilla. Las referencias 61, 62 y 63 divulgan posibles sustituciones con análogos, por ejemplo reemplazo de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG adicionalmente se discute en las referencias 64 a 69.

La secuencia de CpG puede ser dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [70]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria de Th1, tal como un ODN de CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como ODN de CpG-B. Las ODN de CpG-A y CpG-B se discuten en las referencias 71 a 73. Preferiblemente, la CpG es una ODN de CpG-A.

Preferiblemente, se construye el oligonucleótido CpG de modo que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG se pueden unir en sus extremos 3' para formar "inmunómeros" Véase, por ejemplo, referencias 70 y 74 a 76.

Las toxinas de ribosilación de ADP, bacterianas y los derivados destoxificados de las mismas, se pueden utilizar como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina "LT" labil al calor de *E. coli*), cólera ("CT") o tos ferina ("PT"). El uso de las toxinas de ribosilación de ADP destoxificadas, como adyuvantes de mucosa, se describe en la referencia 77 y como adyuvantes parenterales en la referencia 78. La toxina o toxoide preferiblemente está en la forma de una holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferiblemente no se muta la subunidad B. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante LT destoxificado, tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de las toxinas de ribosilación de ADP y los derivados destoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se puede encontrar en las referencias 79 a 86. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos preferiblemente se basa en los alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas de ribosilación de ADP establecidas en la referencia 87.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [88], etc.) [89], interferones (por ejemplo interferón- γ), factor de estimulación de colonias de macrófagos, y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

- 5 También se pueden utilizar bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [90] o mucoadhesivos tales como derivados entrecruzados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También se pueden utilizar quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención [91].

H. Micropartículas

- 10 También se pueden utilizar micropartículas como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (por ejemplo una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, más preferiblemente ~200 nm a ~30 μ m de diámetro, y lo más preferiblemente ~500 nm a ~10 μ m de diámetro) formadas de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo un poli(ácido α -hidroxi), se prefieren un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido), opcionalmente tratados para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la referencia 39)

Los ejemplos de formulaciones de liposomas, adecuados para uso como adyuvantes, se describen en las referencias 92 a 94.

20 J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

- Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [95]. Dichas formulaciones incluyen adicionalmente surfactantes de éster de polioxietilensorbitán, en combinación con un octoxinol [96] así como surfactantes de éteres o ésteres de alquilo de polioxietileno en combinación con por lo menos un surfactante no iónico adicional tal como un octoxinol [97]. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: éter de polioxietileno-9- laurilo (laureth 9), éter de polioxietileno-9-steorilo, éter de polioxietileno-8-esteorilo, éter de polioxietileno-4-laurilo, éter de polioxietileno-35-laurilo, y éter de polioxietileno-23-laurilo.

K. Polifosfazeno (PCPP)

Se describen las formulaciones de PCPP, por ejemplo, en las referencias 98 y 99.

30 L. Péptidos de muramilo

Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para uso como adyuvantes en la invención, incluyen N-acetilmuramil- L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), Y N-acetilmuramil- L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-tiaina MTP-PE).

M. Compuestos de Imidazoquinolona

- 35 Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para uso como adyuvantes en la invención, incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo "Resiquimod 3M") descritos adicionalmente en las referencias 100 y 101.

- La invención también puede comprender las combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, se pueden utilizar las siguientes composiciones adyuvantes en la invención: (1) una saponina y una emulsión aceite en agua [102]; (2) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) [103]; (3) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un ésterol) [104]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones aceite en agua [105]; (6) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80TM, 5% de polímero en bloque plurónico L121, y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrónica o agitado en centrifuga para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande. (7) sistema de adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL

+ CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores se describen en el Capítulo 7 de la referencia 39.

5 Se prefiere particularmente el uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, y los antígenos en general se adsorben en estas sales. Preferiblemente se evita el hidróxido de aluminio como un adyuvante si la composición incluye un antígeno Hib. Cuando se utiliza un fosfato de aluminio y se desea no absorber un antígeno al adyuvante, esto se favorece al incluir iones de fosfato libres en solución (por ejemplo mediante el uso de un regulador de fosfato). La prevención de la adsorción también se puede lograr mediante la selección del pH correcto durante el mezclado del antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto de carga cero apropiado, y un orden apropiado de mezclado para los diferentes antígenos en una composición [106].

El fosfato de calcio es otro adyuvante preferido.

Antígenos adicionales

15 Las composiciones de la invención contienen cinco antígenos meningocócicos de proteína básicos. Estos también pueden incluir antígenos adicionales, aunque pueden no contener antígenos meningocócicos de proteína diferentes de los cinco antígeno básicos. Los antígenos adicionales para inclusión pueden ser por ejemplo:

- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B.
- un antígeno de sacárido de serogrupo A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*, tal como el oligosacárido divulgado en la referencia 107 del serogrupo C o los oligosacáridos de la referencia 108.
- un antígeno de sacárido *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo 155, 156 157].
- 20 - un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo 109, 110].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o de núcleo [por ejemplo 110, 111].
- un antígeno de la difteria, tal como el toxoide de difteria [por ejemplo Capítulo 3 de la referencia 112] por ejemplo el mutante CRM₁₉₇[por ejemplo 113].
- 25 - un antígeno del tétanos, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo Capítulo 4 de la referencia 112].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de tos ferina (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo referencias 114 y 115]. También se puede utilizar el antígeno de tos ferina celular.
- una preparación de vesículas de la membrana externa (OMV) del serogrupo B de *N. meningitidis*, tales como aquellas descritas en las referencias 4, 116, 117, 118, etc.
- 30 - uno o varios antígenos de polio [por ejemplo 119, 120] tal como OPV o preferiblemente IPV.

35 La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales. Los antígenos normalmente estarán presentes a una concentración de por lo menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno. Se prefiere que la eficacia protectora de los antígenos de sacáridos individuales no sea eliminada al combinarlos, aunque puede ser reducida la inmunogenicidad efectiva (por ejemplo los títulos de ELISA).

40 Cuando se incluye un antígeno de la difteria en la composición, también se prefiere incluir antígenos de tétanos y antígeno de tos ferina. Similarmente, cuando se incluye un antígeno de tétanos se prefiere también incluir antígenos de difteria y antígenos de tos ferina. Similarmente, cuando se incluye un antígeno de tos ferina, también se prefiere incluir antígenos de difteria y tétanos. Dichas combinaciones de DTP se pueden utilizar para reconstituir los conjugados liofilizados.

Cuando se utiliza un antígeno de sacárido o carbohidrato es utilizado, preferiblemente se conjuga a una proteína portadora con el fin de aumentar la inmunogenicidad (véase más adelante).

Los antígenos de proteína tóxicos se pueden destoxificar cuando sea necesario (por ejemplo destoxificación de la toxina de tos ferina por medios químicos y/o genéticos [115]).

5 Como una alternativa al uso de los antígenos de proteína en la composición de la invención, el ácido nucleico que codifica para el antígeno se puede utilizar [por ejemplo referencias 121 a 129]. Los componentes de proteína de las composiciones de la invención de este modo se pueden reemplazar por ácido nucleico (preferiblemente ADN, por ejemplo en la forma de un plásmido) que codifica la proteína. Similarmente, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imitan los antígenos de sacáridos por ejemplo mimotopos [130] o anticuerpos antiidiotipo. Estos pueden reemplazar los componentes de sacáridos individuales, o pueden complementarlos. Como un ejemplo, la vacuna puede comprender un mimético de péptido del polisacárido capsular MenC [131] o MenA [132] en lugar del sacárido en sí mismo.

Composiciones particularmente preferidas de la invención incluyen uno, dos o tres de: (a) antígenos de sacáridos de serogrupos Y, W135, C de y (opcionalmente) A de meningococos; (b) un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B; y/o (c) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*. Una composición que comprende los antígenos del serogrupo B y se prefiere particularmente un conjugado de Hib.

15 Serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de Meningococos

Como se mencionó anteriormente, se han conocido por muchos años las vacunas de polisacáridos contra los serogrupos A, C, W135 e Y. Estas vacunas (MENCEVAX ACWY™ y MENOMUNE™) se basan en polisacáridos capsulares de los organismos y, aunque son efectivas en adolescentes y adultos, dan una pobre respuesta inmunitaria y corta duración de protección, y no se pueden utilizar en infantes.

20 En contraste a los antígenos de polisacáridos no conjugados en estas vacunas, las vacunas del serogrupo C recientemente aprobadas (Menjugate™ [133,107], Meningitec™ y NeisVac-C™ incluyen sacáridos conjugados. Menjugate™ y Meningitec™ tienen antígenos de oligosacáridos conjugados con un portador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac-C™ utiliza el polisacárido completo (des-O-acetilado) conjugado a un portador del toxoide tetánico.

25 Las composiciones de la presente invención incluyen preferiblemente antígenos de sacáridos capsulares de uno o más los serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococos, en los que los antígenos se conjugan a proteínas portadoras y/o son oligosacáridos.

Una cantidad típica de cada antígeno de sacárido neumocócico por dosis, está entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, o aproximadamente 10 µg (expresado como sacárido).

30 Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, la relación (peso/peso) del sacárido MenA: sacárido MenC puede ser mayor de 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares del serogrupo Y, y uno o ambos de los serogrupos C y W135, la relación (peso/peso) del sacárido MenY:sacárido MenW135 puede ser mayor de 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor) y/o que la relación (peso/peso) del sacárido MenY:sacárido MenC puede ser menor de 1 (por ejemplo 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o menor). Las relaciones preferidas (peso/peso) para los sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1. Las relaciones preferidas (peso/peso) para los sacáridos de los serogrupos C:W135:Y son: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1; y 2:1:1. Se prefiere utilizar una masa sustancialmente igual de cada sacárido.

40 Los sacáridos capsulares serán utilizados en general en la forma de oligosacáridos. Estos se forman convenientemente formados mediante fragmentación del polisacárido capsular purificado (por ejemplo mediante hidrólisis), que usualmente será seguida por purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

45 La fragmentación de los polisacáridos preferiblemente se realiza para dar un grado promedio final de polimerización (DP) en el oligosacárido menor de 30 (por ejemplo entre 10 y 20, preferiblemente alrededor de 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferiblemente alrededor de 15 a 20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). DP puede ser convenientemente medida mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [134].

50 Si se realiza la hidrólisis, el hidrolizado en general se ajustará a tamaño con el fin de eliminar los oligosacáridos de longitud corta [135]. Esto se puede lograr de diversas maneras, tal como la ultrafiltración, seguida por cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización menor que o igual a aproximadamente 6 preferiblemente se eliminan para el serogrupo A, y aquellos menores de alrededor de 4 preferiblemente se eliminan para los serogrupos W135 e Y.

Los antígenos de sacárido MenC preferidos se divulgan en la referencia 133, como se utiliza en Menjugate™.

Se puede modificar químicamente el antígeno de sacárido.

Esto es particularmente útil para reducir la hidrólisis para el serogrupo A [136; véase adelante]. Se puede realizar la des-O-acetilación de los sacáridos meningocócicos. Para los oligosacáridos, la modificación puede tener lugar antes o después de la despolimerización.

5 Cuando una composición de la invención incluye un antígeno del sacárido MenA, el antígeno es preferiblemente un sacárido modificado en el cual uno o más de los grupos hidroxilo sobre el sacárido nativo se ha/han reemplazado por un grupo bloqueador [136]. Esta modificación mejora la resistencia a la hidrólisis, y significa que el antígeno del serogrupo A se puede almacenar y utilizar en una formulación líquida en vez de requerir liofilización.

10 El número de unidades de monosacárido que tienen grupos bloqueadores puede variar. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueadores. Alternativamente, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueadores. Por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueadores.

15 De igual modo, el número de grupos bloqueadores sobre una unidad de monosacárido puede variar. Por ejemplo, el número de grupos bloqueadores sobre una unidad de monosacárido puede ser de 1 o 2. El grupo bloqueador en general estará en la posición 4 y/o en la posición 3 de las unidades de monosacáridos.

20 La unidad de monosacárido terminal puede o no tener un grupo bloqueador en vez de su hidroxilo nativo. Se prefiere conservar un grupo hidroxilo anomérico libre sobre una unidad de monosacárido terminal, con el fin de proporcionar una palanca para reacciones adicionales (por ejemplo conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos se pueden convertir a grupos amino (-NH₂ o -NH-E, donde E es un grupo protector de nitrógeno) mediante aminación reductora (utilizando por ejemplo NaBH₃CN/NH₄Cl), luego se pueden regenerar después de que otros grupos hidroxilo se han convertido a grupos bloqueadores.

25 Los grupos bloqueadores para reemplazar los grupos hidroxilo pueden ser directamente accesibles por medio de reacción de derivación del grupo hidroxilo, por ejemplo mediante el reemplazo del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo, con otro grupo. Los derivados adecuados de los grupos hidroxilo que actúan como grupos bloqueadores son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo éteres de sililo o éteres de alquilo) y acetales. Algunos ejemplos específicos de dichos grupos bloqueadores son alilo, Alloc, bencilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc.. Otros grupos bloqueadores que no son directamente accesibles y que reemplazan completamente el grupo hidroxilo incluyen alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, NR¹R² (R¹ y R² se definen en el siguiente párrafo), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂Z (alquilo de 1 a 6 átomos de carbono), CN, CF₃, CCl₃, etc. Los grupos bloqueadores preferidos son grupos que aceptores de electrones.

35 Los grupos bloqueadores preferidos son de la fórmula: -O-X-Y o -OR³ en la que : X es C(O), S(O) o SO₂; Y es alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales se puede sustituir opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos independientemente seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o Y es NR¹R²; R¹ y R² se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆; o R¹ y R² se pueden unir para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂; R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, cada uno de los cuales se puede sustituir opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos independientemente seleccionados de F, Cl, Br, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o R³ es arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales se puede sustituir opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃. Cuando R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, se sustituye normalmente con 1, 2 o 3 grupos como se definió anteriormente. Cuando R¹ y R² se unen para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂, esto significa que R¹ y R² juntos con el átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 o 2 heteroátomos (tales como N, O o S) diferentes del átomo de nitrógeno. Ejemplos de grupos heterocíclicos saturados son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidínilo y aziridinilo.

50 Se pueden preparar los grupos bloqueadores -O-X-Y y -OR³ a partir de los grupos -OH mediante procedimientos de derivación estándares, tales como reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, etc. Por lo tanto, el átomo de oxígeno en -O- X-Y es preferiblemente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y en -O-X-Y preferiblemente reemplaza el átomo hidrógeno del grupo hidroxilo.

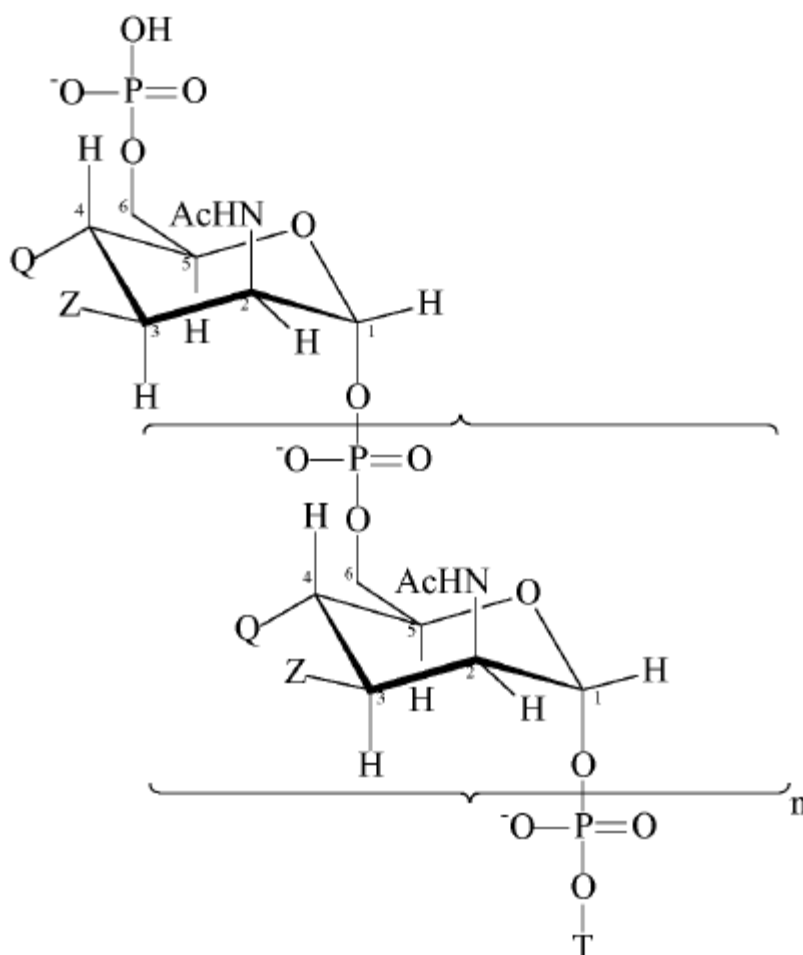
Alternativamente, los grupos bloqueadores pueden ser accesibles a través de una reacción de sustitución, tal como una sustitución tipo Mitsunobu. Estos y otros métodos para preparar los grupos bloqueadores a partir de los grupos hidroxilo, son bien conocidos.

5 Mas preferiblemente, el grupo bloqueador es $-\text{OC}(\text{O})\text{CF}_3$ [137], o un grupo carbamato $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de alquilo C_{1-6} . Más preferiblemente, R^1 y R^2 son ambos metilo es decir el grupo bloqueador es $-\text{OC}(\text{O})\text{NMe}_2$. Los grupos bloqueadores de carbamato tienen un efecto estabilizador sobre el enlace glucosídico, y se pueden preparar bajo condiciones suaves.

10 Los sacáridos MenA modificados preferidos contienen n unidades de monosacáridos, donde por lo menos el $h\%$ de las unidades de monosacáridos no tienen grupos $-\text{OH}$ en ambas posiciones 3 y 4. El valor de h es 24 o mayor (por ejemplo 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100) y es preferiblemente 50 o mayor. Los grupos $-\text{OH}$ ausentes son preferiblemente grupos bloqueadores como se definió anteriormente.

15 Otros sacáridos MenA modificados, preferidos, comprenden las unidades de monosacáridos, en las que por lo menos s de las unidades de monosacáridos no tienen $-\text{OH}$ en la posición 3 y no tienen $-\text{OH}$ en la posición 4. El valor de s es por lo menos 1 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90). Los grupos $-\text{OH}$ ausentes son preferiblemente grupos bloqueadores como se definió anteriormente.

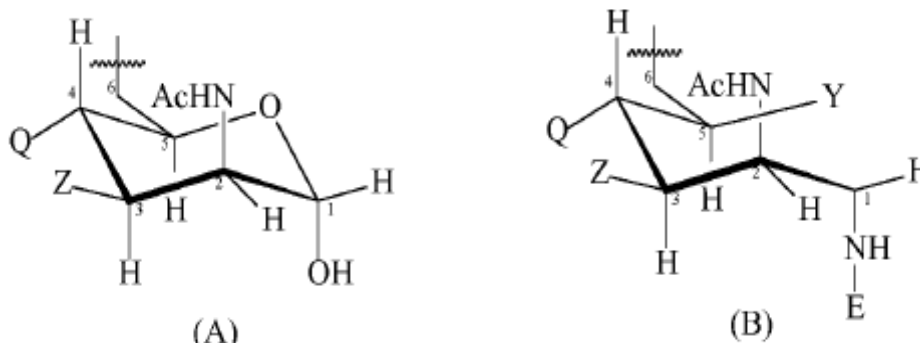
Los sacáridos MenA modificados adecuados para uso con la invención, tienen la fórmula:



en la que

20 n es un número entero de 1 a 100 (preferiblemente un número entero de 15 a 25);

T es de la fórmula (A) o (B):



cada grupo Z se selecciona independientemente de OH o un grupo bloqueador como se definió anteriormente; y cada grupo Q se selecciona independientemente de OH o un grupo bloqueador como se definió anteriormente;

Y se selecciona de OH o un grupo bloqueador como se definió anteriormente;

5 E es H o un grupo protector de nitrógeno;

y en el que más de aproximadamente 7% (por ejemplo 8%, 9%, 10% o más) de los grupos Q son grupos bloqueadores.

10 Cada uno de los grupos $n+2Z$ puede ser el mismo o diferente uno del otro. De igual modo, cada uno de los grupos $n+2Q$ puede ser el mismo o diferente uno del otro. Todos los grupos Z pueden ser OH. Alternativamente, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% de los grupos Z pueden ser OAc. Preferiblemente, aproximadamente 70% de los grupos Z son OAc, con el resto de los grupos Z que son OH o grupos bloqueadores, como se definió anteriormente. Por lo menos aproximadamente 7% de los grupos Q son grupos bloqueadores. Preferiblemente, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 99% o incluso 100% de los grupos Q son grupos bloqueadores.

15 Las composiciones preferidas de la invención pueden ser almacenadas durante 28 días a 37° C y, después de ese periodo, menos de $f\%$ de la cantidad total inicial del sacárido MenA conjugado, estará no conjugada, donde f es 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o menos.

20 Los polisacáridos capsulares de meningococos normalmente se preparan mediante un procedimiento que comprende las etapas de precipitación del polisacárido (por ejemplo utilizando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción con fenol frío (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [por ejemplo referencia 138]. Sin embargo, un procedimiento más preferido [108], involucra la precipitación del polisacárido, seguido por solubilización del polisacárido precipitado, utilizando un alcohol inferior. La precipitación se puede lograr utilizando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo las sales de bromuro), o las sales de bromuro de hexadimetrina y de miristiltrimetilamonio. Particularmente se prefiere el bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') [139]. Se puede lograr la solubilización del material precipitado utilizando un alcohol inferior tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc., pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar los complejos CTAB-polisacárido. El etanol preferiblemente se agrega al polisacárido precipitado para dar una concentración final (con base en el contenido total de etanol y agua) de entre 50% y 95%.

30 Después de la resolubilización, el polisacárido se puede tratar adicionalmente para eliminar los contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones donde incluso la contaminación menor no es aceptable (por ejemplo para la producción de vacunas humanas). Esto involucrará normalmente una o más etapas de filtración, por ejemplo filtración profunda, filtración a través de carbono activado, filtración por tamaño y/o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar contaminantes, se puede precipitar el polisacárido para tratamiento y/o procesamiento posteriores. Esto se puede lograr convenientemente mediante intercambio de cationes (por ejemplo mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

Como una alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares de la presente invención se pueden obtener mediante síntesis total o parcial, por ejemplo la síntesis de Hib se describe en la referencia 140, y la síntesis de MenA en la referencia 141.

40 Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de por lo menos dos serogrupos de *N. meningitidis*. Los sacáridos preferiblemente se preparan de manera separada (que incluyen cualquier fragmentación, conjugación, modificación, etc.) y luego se mezclan para dar una composición de la invención.

5 Sin embargo, cuando la composición comprende un sacárido capsular del serogrupo A, se prefiere que el sacárido del serogrupo A no se combine con los otros sacáridos hasta poco antes del uso, con el fin de minimizar el potencial para la hidrólisis. Esto se puede lograr convenientemente al tener el componente del serogrupo A (normalmente junto con excipientes apropiados) en forma liofilizada y los otros componentes del serogrupo en forma líquida (también con excipientes apropiados), con los componentes líquidos que se utilizan para reconstituir el componente MenA liofilizado, cuando está listo para uso. Cuando se utiliza un adyuvante de sal de aluminio, se prefiere incluir el adyuvante en el vial que contiene la vacuna líquida, y liofilizar el componente MenA sin adyuvante.

10 De este modo se puede preparar una composición de la invención desde un conjunto que comprende: (a) sacárido capsular del serogrupo A de *N.meningitidis*, en forma liofilizada; y (b) antígenos adicionales de la composición, en forma líquida.

15 Dentro de cada dosis, la cantidad de un antígeno de sacárido individual estará en general entre 1 a 50 µg (medido como masa de sacárido), con aproximadamente 2,5 µg, 5 µg o 10 µg de cada uno, lo que se prefiere. Con relaciones en peso A:C:W135:Y de 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1, por lo tanto, la cantidad representada por la Figura 1 es preferiblemente aproximadamente 2,5 µg, 5 µg o 10 µg. Para una composición A:C:W:Y con relación de 1:1:1:1 y 10 µg por sacárido, por lo tanto, se administran 40 µg de sacárido por dosis. Las composiciones preferidas tienen aproximadamente el siguiente µg de sacárido por dosis:

A	10	0	0	0	10	5	2,5
C	10	10	5	2,5	5	5	2,5
W135	10	10	5	2,5	5	5	2,5
Y	10	10	5	2,5	5	5	2,5

20 Las composiciones preferidas de la invención comprenden menos de 50 µg de sacárido de meningococo por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 40 µg de sacárido de meningococo por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden y ≤30 µg de sacárido de meningococo por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 25 µg de sacárido de meningococo por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 20 µg de sacárido de meningococo por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 10 µg de sacárido de meningococo por dosis pero, idealmente, las composiciones de la invención comprenden por lo menos 10 µg de sacárido de meningococo por dosis.

30 Los conjugados de MenC Menjugate™ y NeisVac™ utilizan un adyuvante de hidróxido, mientras que Meningitec™ utiliza un fosfato. Es posible, en las composiciones de la invención, adsorber algunos antígenos hacia un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. Para combinaciones de serogrupo tetravalente, por ejemplo, están disponibles las siguientes permutaciones:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)															
	A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Para combinaciones del serogrupo trivalente de *N. meningitidis*, están disponibles las siguientes permutaciones:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)							
	C	P	H	H	H	P	P	P
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

***Haemophilus influenzae* tipo B**

- 5 Cuando la composición incluye un antígeno de *Haemophilus influenzae* tipo B, este normalmente será un antígeno de sacárido capsular Hib. Los antígenos de sacáridos provenientes de b son bien conocidos.

Ventajosamente, el sacárido Hib se conjuga covalentemente a una proteína portadora, con el fin de aumentar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados polisacáridos en general, y del polisacárido capsular Hib en particular, está bien documentada [por ejemplo referencias 142 a 150, etc.]. La invención puede utilizar cualquier conjugado de Hib adecuado. Las proteínas portadoras adecuadas se describen adelante, y los portadores preferidos para los sacáridos Hib son CRM₁₉₇('HbOC'), toxoide tetánico ('PRP-T') y el complejo de la membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

15 La fracción de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo el fosfato de polirribosilribitol de longitud completa (PRP)), pero se prefiere hidrolizar los polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo peso molecular de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 kDa).

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido Hib covalentemente unido a CRM_{197a} través de un ligador de ácido adípico [151, 152]. El toxoide tetánico es también un portador preferido.

La administración del antígeno Hib preferiblemente, da como resultado una concentración de anticuerpo anti-PRP ≤ 0,15 µg/ml, y más preferiblemente ≤ 1 µg/ml.

- 20 Las composiciones de la invención pueden comprender más de un antígeno Hib.

Cuando una composición incluye un antígeno de sacárido Hib, se prefiere que tampoco incluya un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno Hib se puede adsorber en el adyuvante [153] o puede ser no adsorbido [154].

Se pueden liofilizar los antígenos Hib, por ejemplo junto con los antígenos de meningococo.

Streptococcus pneumoniae

30 Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, este normalmente será un antígeno de sacárido capsular, el cual preferiblemente se conjuga a una proteína portadora [por ejemplo referencias 155 a 157]. Se prefiere incluir los sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se utilizan ampliamente las mezclas de polisacáridos de 23 diferentes serotipos, ya que son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 diferentes serotipos [158]. Por ejemplo, PrevNar™ [159] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18'2, 19F y 23F) con cada sacárido individualmente conjugado a CRM₁₉₇ mediante aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por 0,5 ml de dosis (4 µg de serotipo 6B), y con conjugados adsorbidos sobre un adyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluyen preferiblemente por lo menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados se pueden adsorber sobre un fosfato de aluminio.

35 Como una alternativa al uso de los antígenos de sacáridos de neumococos, la composición puede incluir uno o más antígenos de polipéptidos. Están disponibles las secuencias genómicas para varias cepas de neumococos [160, 161], y pueden ser sometidas a vacunación inversa [162-165] para identificar los antígenos de polipéptidos adecuados [166, 167]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los siguientes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp130, como se define en la referencia 168. La composición puede incluir más de uno (por ejemplo 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14) de estos antígenos.

En algunas realizaciones, la composición puede incluir antígenos de sacáridos y de polipéptidos de neumococos. Estos se pueden utilizar en mezcla simple, o el antígeno de sacárido neumocócico se puede conjugar a una proteína neumocócica. Las proteínas portadoras adecuadas para dichas realizaciones incluyen los antígenos enumerados en el párrafo previo [168].

- 5 Se pueden liofilizar los antígenos de neumococo, por ejemplo junto con antígenos de meningococo y/o Hib.

Conjugación covalente

10 Los sacáridos capsulares en las composiciones de la invención usualmente se conjugarán a una o varias proteínas portadoras. En general, la conjugación aumenta la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte de antígenos independientes de T a antígenos dependientes de T, permitiendo de este modo la entrada para la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida [por ejemplo revisado en las referencias 169 y 142-150].

15 Las proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoide de difteria o toxoide del tétanos. Se prefiere particularmente el toxoide de difteria CRM₁₉₇ [170- 172]. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [173], péptidos sintéticos [174, 175], proteínas de choque térmico [176, 177], proteínas de tos ferina [178, 179], citoquinas [180], linfocinas [180], hormonas [180], factores de crecimiento [180], proteínas artificiales que comprenden epítopos de células T CD4⁺ humanas múltiples, de diversos antígenos derivados de patógenos [181], proteína D de *H. influenzae* [182, 183], proteína PspA de superficie del neumococo [184], proteínas de captación de hierro [185], toxina A o B de *C. difficile* [186], etc. Los portadores preferidos son toxoides de la difteria, toxoide del tétanos, proteína D de *H. influenzae* y CRM₁₉₇.

20 Dentro de una composición de la invención, es posible utilizar más de una proteína portadora, por ejemplo para reducir el riesgo de supresión de portador. De este modo, se pueden utilizar diferentes proteínas portadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo se pueden conjugar sacáridos del serogrupo A a CRM₁₉₇, mientras que los sacáridos del serogrupo C se pueden conjugar al toxoide tetánico. También es posible utilizar más de una proteína portadora para un antígeno de sacárido particular, por ejemplo sacáridos del serogrupo A pueden estar en dos grupos, con algunos conjugados a CRM₁₉₇ y otros conjugados al toxoide tetánico. Sin embargo, en general se prefiere utilizar la misma proteína portadora para todos los sacáridos.

30 Una proteína portadora simple puede llevar más de un antígeno de sacárido [187]. Por ejemplo, una proteína portadora simple puede tener conjugados a esta los sacáridos de los serogrupos A y C. Para lograr esta meta, los sacáridos pueden ser mezclados antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo.

Se prefieren los conjugados con una relación sacárido: proteína (peso/peso) de entre 1:5 (por ejemplo proteína en exceso) y 5:1 (es decir sacárido en exceso). Se prefieren las relaciones entre 1:2 y 5:1 son las preferidas, y son más preferidas las relaciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Se puede preferir la proteína portadora en exceso para MenA y MenC.

35 Los conjugados se pueden utilizar en conjunto con la proteína portadora libre [188]. Cuando una proteína portadora dada está presente en forma libre y conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferiblemente no mayor de 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, y más preferiblemente a menos de 2% en peso.

40 Cualquier reacción de conjugación adecuada se puede utilizar, con cualquier ligador adecuado, cuando sea necesario. El sacárido será normalmente activado o funcionalizado antes de la conjugación. La activación puede involucrar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio [189, 190, etc.]). Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 148).

45 Los enlaces a través de un grupo ligador pueden ser realizados utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 191 y 192. Un tipo de enlace involucra la aminación reductora del polisacárido, el acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo ligador de ácido adípico, y luego acoplar una proteína al otro extremo del grupo ligador de ácido adípico [146, 193, 194]. Otros ligadores incluyen B-propionamido [195], nitrofenil-etilamina [196], haluros de haloacilo [197], enlaces glucosídicos [198], ácido 6- aminocaproico [199], ADH [200], unidades estructurales de C₄ a C₁₂ [201], etc. Como una alternativa a utilizar un ligador, se puede utilizar un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido, seguido por la aminación reductora con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las referencias 202 y 203.

Se prefiere un procedimiento que involucra la introducción de grupos amino dentro del sacárido (por ejemplo al reemplazar los grupos =O terminales con -NH₂) seguido por derivación con un diéster adípico (por ejemplo el diéster de N-hidroxisuccinimido del ácido adípico) y reacción con la proteína portadora. Otra reacción preferida utiliza la activación de CDAP con un portador de proteína D por ejemplo para MenA y MenC.

- 5 Después de la conjugación, se pueden separar los sacáridos libres y conjugados. Pueden existir muchos métodos adecuados, que incluyen cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc. [véase también las referencias 204 y 205, etc.].

Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, se prefiere que la preparación del oligosacárido preceda a la conjugación.

10 Antígenos de polipéptidos del serogrupo B adicionales y alternativos

La invención proporciona una composición como se define en las reivindicaciones, la cual, después de administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo en ese sujeto, en donde la respuesta de anticuerpo es bactericida contra dos o tres de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3 de serogrupo B de *N. meningitidis*.

- 15 Aunque NadA, 741, 936, 953 y 287 son antígenos preferidos para lograr esta amplia protección, otros antígenos de polipéptidos MenB que se pueden incluir en las composiciones de la invención (en combinación con los cinco antígenos básicos que se definen en las reivindicaciones) incluyen aquellos que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO:650 de la referencia 8; SEQ ID NO:878 de la referencia 8; SEQ ID NO:884 de la referencia 8; SEQ ID NO:4 de la referencia 9; SEQ ID NO:598 de la referencia 10; SEQ ID NO:818 de la referencia 10; SEQ ID NO:864 de la referencia 10; SEQ ID NO:866 de la referencia 10; SEQ ID NO:1196 de la referencia 10; SEQ ID NO:1272 de la referencia 10; SEQ ID NO:1274 de la referencia 10; SEQ ID NO:1640 de la referencia 10; SEQ ID NO:1788 de la referencia 10; SEQ ID NO:2288 de la referencia 10; SEQ ID NO:2466 de la referencia 10; SEQ ID NO:2554 de la referencia 10; SEQ ID NO:2576 de la referencia 10; SEQ ID NO:2606 de la referencia 10; SEQ ID NO:2608 de la referencia 10; SEQ ID NO:2616 de la referencia 10; SEQ ID NO:2668 de la referencia 10; SEQ ID NO:2780 de la referencia 10; SEQ ID NO:2932 de la referencia 10; SEQ ID NO:2958 de la referencia 10; SEQ ID NO:2970 de la referencia 10; SEQ ID NO:2988 de la referencia 10, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que : (a) tiene 50% o más de identidad (por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de por lo menos n aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, en el que n es 7 o más (por ejemplo 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítipo de la secuencia relevante. Se puede incluir más de uno (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos.

General

El término "que comprende" significa "que incluye" así como "que consiste" por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

- 35 El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, se puede omitir la palabra "sustancialmente" de la definición de la invención.

- 40 Las referencias a una identidad de secuencia porcentual entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo en comparación con las dos secuencias. Este alineamiento y la homología porcentual o la identidad de secuencia se pueden determinar utilizando los programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo aquellos descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 206. Un alineamiento preferido se determina por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman utilizando una búsqueda de espacios afines con una penalidad de espacio abierto de 12 y una penalidad por extensión de espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se muestra en la referencia 207.

- 50 El término "alquilo" se refiere a los grupos alquilo en las formas lineal o ramificada. El grupo alquilo se puede interrumpir con 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo también se puede interrumpir por 1, 2 o 3 dobles y/o triples enlaces. Sin embargo, el término "alquilo" usualmente se refiere a grupos alquilo que no tienen interrupciones de heteroátomo o interrupciones de doble o triple enlace. Cuando se hace referencia a alquilo C₁₋₁₂, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). Similarmente, cuando se hace referencia a alquilo C₁₋₆, se

entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

5 El término "cicloalquilo" incluye los grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, así como las combinaciones de estos con grupos alquilo, tales como los grupos cicloalquilalquilo. El grupo cicloalquilo se puede interrumpir con 1, 2 o 3 heteroátomos, seleccionados de -O-, -NH- o -S-. Sin embargo, el término "cicloalquilo" usualmente se refiere a los grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C₃₋₁₂, se entiende que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

10 El término "arilo" se refiere a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia al arilo C₅₋₁₂, se entiende que el grupo arilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (por ejemplo C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

El término "arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆" se refiere a los grupos tales como bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

15 Los grupos protectores de nitrógeno incluyen grupos sililo (tales como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tales como ftalimidias, trifluoroacetamidias, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tales como β-trimetilsililetansuafonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C₁₋₁₂, bencilo, benzhidrido, trilito, 9-fenilfluorenilo, etc. Un grupo protector de nitrógeno preferido, es Fmoc.

20 Las secuencias incluidas para facilitar la clonación o purificación, etc., no necesariamente contribuyen a la invención y se pueden omitir o eliminar.

Se apreciará que los anillos de azúcar puedan existir en la forma abierta y cerrada y que, mientras que se muestran las formas cerradas en las fórmulas estructurales aquí, las formas abiertas también son abarcadas por la invención.

Modos de llevar a cabo la invención

25 **Proteína híbrida ΔG287-953**

El ADN que codifica la proteína 287 de la cepa 394/98 del serogrupo B de meningococo, y la proteína 953 de la cepa 2996 del serogrupo B de meningococo, se digirieron y ligaron, junto con una secuencia ligadora corta, para dar un plásmido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. El plásmido se transfectó dentro de E. coli y las bacterias se desarrollaron para expresar la proteína.

30 Después del crecimiento adecuado, las bacterias se cosecharon y se purificó la proteína. A partir del cultivo, las bacterias se centrifugaron y el sedimento se homogenizó en presencia de regulador de acetato 50 mM (pH 5) con una relación en volumen de sedimento: regulador de 1:8. La lisis se realizó utilizando un homogeneizador de alta presión (AVESTIN, 4 ciclos a 1400 psi). Después de lisis, se agregó urea a una concentración final de 5 M, seguido por agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. El pH se redujo de 6 a 5 utilizando regulador de acetato 200
35 mM (pH 4) + urea 5 M. La mezcla se centrifugó a 16800 g durante 60 minutos a 2-8° C. El sobrenadante se recolectó y se filtró por SARTOBRAN P (0,45- 0,22 μm SARTORIUS).

La proteína en el sobrenadante filtrado se estableció durante ≥ 30 días a -20° C y durante ≤ 15 días a 2-8° C.

40 La proteína adicionalmente se purificó sobre una columna de intercambio catiónico (SPFF, Amersham Biosciences) con elución utilizando NaCl 350 mM + acetato 50 mM + urea 5 M pH 5,00. La mayoría de las impurezas estuvieron presentes en el flujo continuo. Un lavado de preelución utilizando una menor concentración de NaCl (180 mM) eliminó ventajosamente dos proteínas de E. coli contaminantes.

El material eluido se ajustó a pH 8 (utilizando TRIS 200 mM/HCl + urea 5 M, pH 9) y posteriormente se purificó sobre una columna Q Sepharose HP (Amersham) con elución utilizando NaCl 150 mM + TRIS 20 mM/HCl pH 8,00 en urea 5 M. Nuevamente, un lavado de preelución con sal reducida (90 mM) fue útil para eliminar las impurezas.

45 El material eluido y filtrado de la columna de Q HP se diluyó 1:2 utilizando PBS pH 7,00 (NaCl 150 mM + fosfato de potasio 10 mM, pH 7,00) y luego se diafiltró contra 10 volúmenes de PBS pH 7,00 mediante ultrafiltración tangencial. Al final de la diafiltración el material se concentró 1,6 veces hasta aproximadamente 1,2 mg/ml de proteínas totales. Utilizando una membrana de corte de 30.000 Da (membrana de celulosa regenerada de 50 cm², Millipore PLCTK 30) fue posible dializar el material con un rendimiento de aproximadamente 90%.

Proteína híbrida 936-ΔG741

5 El ADN que codifica la proteína 936 de la cepa 2996 del serogrupo B de meningococo y la proteína 741 de la cepa MC58 del serogrupo B de meningococo se digirió y se ligó, junto con una secuencia ligadora corta, para dar un plásmido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. El plásmido se transfectó dentro de E. coli y las bacterias se desarrollaron para expresar la proteína. La proteína recombinante no se secretó, pero permaneció soluble dentro de la bacteria.

Después del crecimiento adecuado, las bacterias se centrifugaron para dar una pasta húmeda y se trataron como sigue:

- homogenización mediante el sistema de alta presión en presencia de fosfato de sodio 20 mM pH 7,00.
- 10 - centrifugación y clarificación mediante filtración ortogonal.
- Cromatografía de columna catiónica (Flujo Rápido SP Sepharose), con elución con NaCl 150 mM en fosfato de sodio 20 mM pH 7,00.
- Cromatografía de columna aniónica (Q Sepharose XL) con recolección de flujo pasante.
- 15 - Cromatografía de columna hidrófoba (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) con elución con fosfato de sodio 20 mM, pH 7,00.
- diafiltración contra PBS pH 7,4 con un corte de 10 Kd.
- Filtración estéril final y almacenamiento a -20° C.

La proteína en el material final fue estable durante por lo menos 3 meses a -20° C y a 2-8° C.

Proteína NadA^{(NL)(C)}

20 El ADN que codifica la proteína NadA de la cepa 2996 del serogrupo B de meningococo se digirió para eliminar la secuencia que codifica su extremo C, para dar un plásmido que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. El plásmido se transfectó dentro de E. coli y las bacterias se desarrollaron para expresar la proteína. La proteína recombinante se secretó hacia el medio de cultivo, y el péptido líder estuvo ausente en la proteína secretada (SEQ ID NO: 2). El sobrenadante se trató como sigue:

- 25 - Concentración 7X y diafiltración contra regulador TRIS 20 mM/HCl pH 7,6 por flujo cruzado UF (Corte de 30 Kd).
- Cromatografía en columna aniónica (Q Sepharose XL), con elución por NaCl 400 mM en TRIS 20 mM/HCl pH 7,6.
- Etapa de de cromatografía de columna hidrófoba (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub), con elución con NaCl 50 mM en TRIS/HCl pH 7,6.
- 30 - Cromatografía en columna de cerámica de hidroxilapatita (HA Macro. Prep) con elución con fosfato de sodio 200 mM pH 7,4.
- Diafiltración (corte de 30 Kd) contra PBS pH 7,4.
- Esterilización por filtración final y almacenamiento a -20° C.

La proteína en el material final se estableció durante por lo menos 6 meses a -20° C y a 2-8° C.

35 La proteína NadA es susceptible a degradación, y se pueden detectar formas truncadas de NadA mediante transferencia de Western o mediante espectrometría de masas (por ejemplo mediante MALDI -TOF) que indican una pérdida de peso molecular de hasta 10 kDa. Los productos de degradación se pueden separar de la NadA nativa mediante filtración en gel (por ejemplo utilizando la columna TSK 300SWXL, precolumna TSKSWXL, TOSOKAAS). Dicha filtración da tres picos: (i) un primer pico con tiempo de retención de 12.637 minutos y peso molecular aparente de 885.036 Da; (ii) tiempo de retención 13.871 minutos y peso molecular aparente de 530.388 Da; (iii)

40 tiempo de retención de 13.871 minutos y peso molecular aparente de 530.388 Da. El análisis de dispersión de los tres picos revela valores de peso molecular reales de (i) 208500 Da, (ii) 98460 Da, (iii) 78760 Da. De este modo, el primer pico contiene agregados de NadA, y el tercer pico contiene productos de degradación.

Ya que el peso molecular predicho de NadA^{(NL)(C)} es 34.113 Da, el pico (ii) contiene una proteína trimérica, la cual es el antígeno deseado.

Combinaciones antigénicas

- 5 Se inmunizaron ratones con una composición que comprende las tres proteínas y un adyuvante de hidróxido de aluminio. Para propósitos de comparación, las tres proteínas también se probaron de manera simple. Se utilizaron diez ratones por grupo. La mezcla fue capaz de inducir altos títulos bactericidas contra diversas cepas:

	Cepa de meningococo ^(Serogrupo)							
	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C11 ^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000
Mix	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
¹ indica que esta cepa no contiene ningún gen NadA. Observando ratones individuales, la triple mezcla indujo títulos bactericidas altos y consistentes contra las tres cepas del serogrupo B de las que se derivan los antígenos individuales.								

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

Combinación y comparación con OMVs

- 10 En experimentos adicionales, los antígenos con adyuvante (20 µg de cada antígeno por dosis) se administraron en combinación con 10 µg de OMVs preparados ya sea a partir de la cepa H44/76 (Noruega) o la cepa 394/98 (Nueva Zelanda). Los controles positivos fueron el mAb SEAM-3 p anticapsular para el serogrupo B o los sacáridos capsulares conjugados a CRM₁₉₇ para otras cepas. Los resultados (títulos bactericidas) se muestran en la Tabla 1. La mezcla casi siempre da mejores títulos que los OMVs simples y, adicionalmente, la adición de la mezcla a los OMVs
- 15 casi siempre aumenta significativamente la eficacia de los OMVs. Más aún, en muchos casos la mezcla de antígenos concuerda o excede la respuesta observada con el control positivo.

Pruebas de linaje hipervirulento

Se probaron los siguientes antígenos contra una variedad de cepas del serogrupo B de una variedad de linajes hipervirulentos:

- 20 (a) NadA(NL)
- (b) ΔG287-953
- (c) 936-ΔG741
- (d) una mezcla de (a), (b) y (c)
- (e) OMVs preparados a partir de la cepa H44/76 (Noruega)

(f) OMVs preparados a partir de la cepa 394/98 (Nueva Zelanda)

(g) Una mezcla de ΔG287 y (e)

(h) Una mezcla de (d) y (e)

(i) Una mezcla de (d) y (f)

5 Se utilizó SEAM-3 como un control positivo.

Los resultados fueron como sigue, expresados como el porcentaje de cepas en el linaje hipervirulento indicado donde el título bactericida en suero excedió 1024:

	# Cepas	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	4	50	50	0	100	25	25	25	100	100	+
ET-5	8	25	75	88	100	71	14	71	100	100	+
Linaje 3	13	0	75	15	93	8	85	8	92	93	+
ET-37	4	11	22	0	33	0	0	0	22	25	+

Contra cepas de referencia particular, los títulos bactericidas fueron como sigue:

	Cepa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	961-5945	128	2048	<8	2048	262144	8192	262144	262144	4096	8192
ET-5	44/76	<4	2048	32768	131072	524288	8192	524288	524288	524288	16384
Linaje 3	394/98	<4	1024	32	4096	<4	16384	256	16384	16384	16384
ET-37	LPN17592	2048	1024	256	4096	<8	<8	512	16384	65536	1024

10

Por lo tanto, LAS composiciones (d), (h) e (i) inducen respuestas de anticuerpo bactericidas contra una amplia variedad de cepas del serogrupo B de meningococo dentro de linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3. Los títulos utilizando las composiciones (h) e (i) fueron en general más altos que con (d), pero la cobertura de las cepas dentro de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 no fueron mejores.

15 La cobertura de las cepas no tipificadas también fue alta con las composiciones (d), (h) e (i).

Análisis del dominio N terminal de NadA

20 Se sabe que la proteína NadA de *N. meningitidis*, purificada, se une a células epiteliales humanas [17] (por ejemplo células Chang, células HeLa, células Hep-2), y *E. coli* recombinante que expresa NadA muestra un fenotipo adherente [18]. Estas *E. coli* son capaces de invadir las células epiteliales, y se pueden detectar las *E. coli* NadA^{+ve} en células Chang mediante inmunofluorescencia (después de permeabilización de membrana) y mediante microscopía electrónica. De este modo, se considera que el NadA funciona como una adhesina y una invasina para células epiteliales.

25 Con base en el análisis de la estructura secundaria, la NadA madura se ha subdividido en tres dominios putativos: un dominio globular N terminal (aa 24-87), una región interna de α-hélice (aa 88-350) con alta propensión al enrollamiento, y un ancla de membrana C terminal (aa 351- 405). Se investigó la función del dominio globular N terminal en la interacción de célula anfitriona.

5 Un gen *nadA* truncado que codifica una proteína desprovista de los aminoácidos 30-87 se clonó dentro del vector pET-21 (PET-NadAΔ30-87) y se expresó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Los aminoácidos 24-29 fueron retenidos para permitir el procesamiento del péptido líder y la maduración correcta de la proteína. El análisis de transferencia de Western y de FACS confirmó que NadAΔ30-87 se expresó y formó oligómeros sobre la superficie de las células de *E. coli*, es decir la supresión del dominio N terminal no interfiere con la expresión, exportación y localización de la membrana de NadA. Sin embargo, la cepa de *E. coli* recombinante perdió completamente la capacidad para adherirse a las células epiteliales Chang. El dominio N terminal está implicado de este modo en la actividad de la adhesina.

10 Para investigar adicionalmente cual parte del dominio N terminal esta involucrada en la interacción, la región fue adicionalmente dividida en tres subdominios putativos: los aminoácidos 24-42, que contienen una región de α-hélice predicha con residuos hidrófobos; los aminoácidos 43-70, la parte interna sin una estructura secundaria definida, predicha; y los aminoácidos 71-87 que contienen otra estructura de α-hélice predicha. Las tres construcciones, cada una que codifica una proteína suprimida de un subdominio simple, se generaron y luego se introdujo dentro de *E. coli* BL21(DE3), obteniendo la siguiente cepa: BL21(DE3)/pET-NadAΔ24-42, BL21(DE3)/pET-NadAΔ43-70 y
 15 BL21(DE3)/pET-NadAΔ71-87 La localización superficial de los oligómeros se confirmó por transferencia de Western y análisis de FACS, pero la adhesión a las células epiteliales Chang no fue mejor que la cepa de control de *E. coli* BL21(DE3)/pET. Estos resultados, confirmados también utilizando el análisis de microscopia de inmunofluorescencia, indican que el dominio N terminal globular completo de NadA, es importante en la interacción con células humanas.

20 **Combinación con conjugados meningocócicos y/o Hib**

La composición de MenB triple se combina con una mezcla de conjugados de oligosacáridos para los serogrupos C, W135 e Y, para dar una vacuna que contiene los siguientes antígenos:

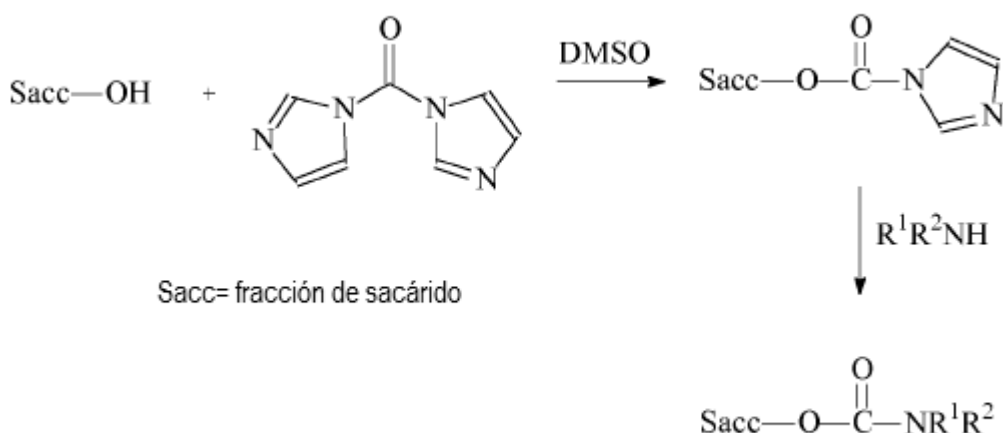
Componente	Cantidad por 0,5 ml de dosis
Conjugado de serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
ΔG287-953	20 µg de polipéptido
936-ΔG741	20 µg de polipéptido
NadA	20 µg de polipéptido

25 Se prepara una vacuna similar, que incluye el conjugado de MenA (10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM₁₉₇) y/o un conjugado HbOC Hib (10 µg del sacárido + 2-5 µg de CRM₁₉₇)

Uso del sacárido MenA modificado

30 El polisacárido capsular se purificó de MenA y se hidrolizó para dar el oligosacárido MenA. Se hidrolizaron 2 g del polisacárido a 50° C en regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 4,75, a una concentración de polisacárido de 10 mg/mL durante aproximadamente 4 horas [135]. Después de hidrólisis, la solución se secó mediante evaporación rotatoria.

El oligosacárido se activó utilizando el siguiente Esquema de Reacción:



El oligosacárido se disolvió en DMSO para dar una concentración de sacárido de 10 mg/mL. De acuerdo con una relación molar del oligosacárido: CDI es 1:20, 21,262 g de CDI luego se agregaron y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El compuesto MenA-CDI resultante fue purificado mediante precipitación selectiva en una mezcla de acetona:DMSO 80:20 (v/v) seguido por centrifugación. La eficiencia de la reacción de activación se calculó como de aproximadamente 67,9% al determinar la relación del imidazol libre con el imidazol unido.

En la segunda etapa de reacción, el oligosacárido MenA-CDI se utilizó en DMSO a una concentración de sacárido de aproximadamente 10 mg/mL. De acuerdo con una relación molar de la unidad MenA-CDI:DMA es de 1:100, se agregaron 36,288 g de clorhidrato de dimetilamina al 99% (es decir R¹ y R² = Me) y la mezcla de reacción se agitó por 16 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se liofilizó y resolubilizó en 10 mg/mL de solución acuosa.

Para eliminar el agente de reacción de bajo peso molecular (en particular la dimetilamina (DMA)) de la preparación de oligosacárido, se realizó una etapa de diálisis a través de una membrana MWCO de 3.5 kDa (Spectra/por™). Se llevaron a cabo cuatro etapas de diálisis: (i) 16 horas contra 2 L de cloruro de sodio 1 M (factor de diálisis 1:20), (ii) 16 horas contra 2 litros de cloruro de sodio 0,5 M (factor de diálisis 1,20), (iii) y (iv) 16 horas contra 2 litros de WFI (factor de diálisis 1:20). Para mejorar la purificación también se realizó una etapa de diafiltración a través de una membrana MWCO de 1 kDa (Centricon™).

El producto Mes-CDI-DMA. Se reguló a pH 6,5 en L-histidina 25 mM (Fluka™).

Para preparar los conjugados del sacárido MenA modificado (MenA-CDI-DMA), el procedimiento completo fue como sigue:

- hidrólisis del polisacárido para dar fragmentos de oligosacáridos
- clasificación por tamaño de los fragmentos oligosacáridos
- aminación reductora de los grupos aldehído terminales sobre los oligosacáridos clasificados por tamaño
- protección de los grupos -NH₂ terminales por el grupo Fmoc antes de la reacción de CDI
- desprotección intrínseca de los grupos -NH₂ durante la reacción de DMA
- activación de los grupos -NH₂ terminales por SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimido-adípico)
- unión covalente a la proteína CRM₁₉₇

El conjugado del oligosacárido MenA modificado es mucho más resistente a la hidrólisis que su contraparte natural a temperaturas elevadas. Después de 28 días a 37° C, por ejemplo, el porcentaje de sacárido liberado es de 6 -4%

para el oligosacárido modificado versus 23,5% para el antígeno natural. Más aún, los títulos inducidos por los oligosacáridos modificados no son significativamente menores que aquellos obtenidos utilizando las estructuras de azúcar nativas.

- 5 El conjugado de MenA modificado se combina con los conjugados de MenC, MenW135 y MenY como un sustituto para el conjugado del oligosacárido no modificado. Esta mezcla tetravalente se combina con los tres polipéptidos MenB para dar una vacuna efectiva contra los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis* en una dosis simple.

Combinaciones de neumococos

- 10 Las tres proteínas MenB combinadas se mezclan con los conjugados del sacárido neumocócico para dar una concentración final de 2 µg/dosis de cada uno de los serotipos neumocócicos (doble para el serotipo 6B). La vacuna reconstituida contiene de este modo los siguientes antígenos:

Componente	Cantidad por 0.5 ml de dosis
Conjugado de serogrupo A	5 µg de sacárido + 6,25-16,5 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo C	5 µg de sacárido + 6,25-12,5 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo W135	5 µg de sacárido + 3,3-10 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo Y	5 µg de sacárido + 3,3-10 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo de neumococo 4	2 µg de sacárido + 2,5 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo de neumococo 9V	2 µg de sacárido + 2,5 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo de neumococo 14	2 µg de sacárido + 2,5 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo de neumococo 18C	2 µg de sacárido + 2,5 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo de neumococo 19F	2 µg de sacárido + 2,5 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo de neumococo 23F	2 µg de sacárido + 2,5 mg CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo de neumococo 6B	4 µg de sacárido + 5 mg CRM ₁₉₇

Se entenderá que se ha descrito la invención solo a modo de ejemplo y se pueden realizar modificaciones mientras que permanezcan dentro del alcance de las reivindicaciones.

REFERENCIAS

- 15 1] Maiden et al. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
 [2] Armand et al. (1982) J. Biol. Stand. 10:335-339.
 [3] Cadoz et al. (1985) Vaccine 3:340-342.
 [4] Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-96
 [5] Parkhill et al. (2000) Nature 404:502-506.
- 20 [6] Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
 [7] WO00/66791.
 [8] WO99/24578.

- [9] WO99/36544.
- [10] WO99/57280.
- [11] WO00/22430.
- [12] WO00/66741.
- 5 [13] Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [14] WO01/64920.
- [15] WO01/64922.
- [16] WO03/020756.
- [17] Comanducci et al. (2002) *J. Exp. Med.* 195:1445-1454.
- 10 [18] WO03/010194.
- [19] UK patent application 0227346.4.
- [20] WO03/063766.
- [21] Masignani et al. (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
- [22] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- 15 [23] Pettersson et al. (1994) *Microb Pathog* 17(6):395-408.
- [24] Welsch et al. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C *Neisseria meningitidis* strains.
- 20 [25] Santos et al. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of *N. meningitidis*.
- [26] WO03/009869.
- [27] WO01/30390.
- [28] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- 25 [29] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [30] WO00/53221.
- [31] Jakobsen et al. (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [32] Wu et al. (1997) *J Infect Dis* 175:839-846.
- [33] Bergquist et al. (1998) *APMIS* 106:800-806.
- 30 [34] Baudner et al. (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [35] Ugozzoli et al. (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [36] Paoletti et al. (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [37] WO00/56365.

- [38] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practise of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [39] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [40] WO00/23105.
- [41] WO90/14837.
- 5 [42] Patente Estadounidense 5,057,540.
- [43] WO96/33739.
- [44] EP-A-0109942.
- [45] WO96/11711.
- [46] WO00/07621.
- 10 [47] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [48] Sjolanderet et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [49] Niikura et al. (2002) *Virology* 293:273-280.
- [50] Lenz et al. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [51] Pinto et al. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- 15 [52] Gerber et al. (2001) *Virology* 75:4752-4760.
- [53] WO03/024480
- [54] WO03/024481
- [55] Gluck et al. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [56] EP-A-0689454.
- 20 [57] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [58] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [59] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [60] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [61] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- 25 [62] WO02/26757.
- [63] WO99/62923.
- [64] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [65] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [66] WO98/40100.
- 30 [67] Patente Estadounidense 6,207,646.
- [68] Patente Estadounidense 6,239,116.

- [69] Patente Estadounidense 6,429,199.
- [70] Kandimalla et al. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
- [71] Blackwell et al. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- [72] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
- 5 [73] WO01/95935.
- [74] Kandimalla et al. (2003) BBRC 306:948-953.
- [75] Bhagat et al. (2003) BBRC 300:853-861.
- [76] WO03/035836.
- [77] WO95/17211.
- 10 [78] WO98/42375.
- [79] Beignon et al. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
- [80] Pizza et al. (2001) Vaccine 19:2534-2541.
- [81] Pizza et al. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- [82] Scharton-Kersten et al. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.
- 15 [83] Ryan et al. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
- [84] Partidos et al. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
- [85] Peppoloni et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.
- [86] Pine et al. (2002) J Control Release 85:263-270.
- [87] Domenighini et al. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
- 20 [88] WO99/40936.
- [89] WO99/44636.
- [90] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [91] WO99/27960.
- [92] Patente Estadounidense 6,090,406
- 25 [93] Patente Estadounidense 5,916,588
- [94] EP-A-0626169.
- [95] WO99/52549.
- [96] WO01/21207.
- [97] WO01/21152.
- 30 [98] Andrianov et al. (1998) Biomaterials 19:109-115.
- [99] Payne et al. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.

- [100] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [101] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [102] WO99/11241.
- [103] WO94/00153.
- 5 [104] WO98/57659.
- [105] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.
- [106] WO96/37222; Patente Estadounidense 6,333,036..
- [107] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [108] WO03/007985.
- 10 [109] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [110] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [111] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [112] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [113] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- 15 [114] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [115] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH*9:232-238.
- [116] WO01/52885.
- [117] Fukasawa et al. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [118] Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- 20 [119] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [120] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [121] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
- [122] Donnelly et al. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- [123] Scott-Taylor & Dalglish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- 25 [124] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- [125] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- [126] Dubensky et al. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- [127] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
- [128] Donnelly et al. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- 30 [129] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
- [130] Charalambous & Feavers (2001) *J Med Microbiol* 50:937-939.

- [131] Westerink (2001) *Int Rev Immunol* 20:251-261.
- [132] Grothaus et al. (2000) *Vaccine* 18:1253-1263.
- [133] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [134] Ravenscroft et al. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- 5 [135] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [136] WO03/080678.
- [137] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
- [138] Frash (1990) p.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [139] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- 10 [140] Kandil et al. (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
- [141] Berkin et al. (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
- [142] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [143] Buttery & Moxon (2000) *JR Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [144] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- 15 [145] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [146] European patent 0477508.
- [147] Patente Estadounidense 5,306,492.
- [148] WO98/42721.
- [149] Dick et al. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- 20 [150] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [151] Kanra et al. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.
- [152] Ravenscroft et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 35-47.
- [153] WO97/00697.
- [154] WO02/00249.
- 25 [155] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [156] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [157] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [158] Zielen et al. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- [159] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- 30 [160] Tettelin et al. (2001) *Science* 293:498-506.
- [161] Hoskins et al (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.

- [162] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
- [163] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.
- [164] Masignani et al. (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
- [165] Mora et al. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- 5 [166] Wizemann et al. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [167] Rigden et al. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.
- [168] WO02/22167.
- [169] Ramsay et al. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [170] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- 10 [171] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [172] Anderson et al. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [173] EP-A-0372501.
- [174] EP-A-0378881.
- [175] EP-A-0427347.
- 15 [176] WO93/17712
- [177] WO94/03208.
- [178] WO98/58668.
- [179] EP-A-0471177.
- [180] WO91/01146
- 20 [181] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [182] EP-A-0594610.
- [183] WO00/56360.
- [184] WO02/091998.
- [185] WO01/72337
- 25 [186] WO00/61761.
- [187] WO99/42130
- [188] WO96/40242
- [189] Lees et al. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
- [190] WO95/08348.
- 30 [191] Patente Estadounidense 4,882,317
- [192] Patente Estadounidense 4,695,624

[193] Porro et al. (1985) Mol Immunol 22:907-919.s

[194] EP-A-0208375

[195] WO00/10599

[196] Gever et al. Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).

5 [197] Patente Estadounidense 4,057,685.

[198] Patente Estadounidenses 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.

[199] Patente Estadounidense 4,459,286.

[200] Patente Estadounidense 4,965,338

[201] Patente Estadounidense 4,663,160.

10 [202] Patente Estadounidense 4,761,283

[203] Patente Estadounidense 4,356,170

[204] Lei et al. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.

[205] WO00/38711; Patente Estadounidense 6,146,902.

[206] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30.

15 [207] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

Tabla 1

	2996	NGH38	M4215	MC58	44/76	CU385	N44/89	394/98	M01-240149	NM092	NM008	BZ198	961-5945	G2136	5/99	F6124	BZ133	LPN17592	240539	
Tipificación:	B:2b.P1.5a.2a	B:NT.P1.3	B:15.P1.7.16	B:15.P1.7.16b	B:15.P1.7.16	B:4.P1.15	B:4.7.P1.19.15	B:4.P1.4	B:4.P1.7.4	B:4.P1.4			B:2b.P1.21.16	B:	B:2b.P1.5.2					
ET:	Otro	Otro	n.d	ET5	ET15	ET15	ET15	lin.3	lin.3	lin.3	lin.3	lin.3	A4	A4	A4		SIII	SI		
Control positivo	32768	32768	32768	16384	16384	>16384	8192	16384	8192	32768	8194	16384	8192	32768	8192		1024		1024	4096
Mezcla de antígenos	4096	4096	65536	32768	65536	>65536	>4096	8192	2048	>4096	4096	4096	2048	2048	>4096		8192	16384	4096	>8192
Antígenos+ H44/76 OMVs	16384	8192	>65536	32768	524288	>65536	>4096	16384	8192	>4696	>4096	>4096	>8192	2048	>4096		32768	32768	16384	>8192
Antígenos+ 394/98 OMV	8192	8192	>65536	32768	>65536	>65536	>4096	65536	>8192	>4096	>4096	>4096	2048	8192	>4096		65536	65536	65536	>8192
OMVs (Noruega)	<4	1024	8192	2048	262144	256	>8	4096	>4	>8	>8	>4	>8192	>8	>8		1024	>4	>8	>4096
OMVs (NZ)	512	>4	128	2048	>4	>8	>8	32768	>8192	4096	1024	4096	>16	n.d	>8		4096	1024	>8	>4096

20

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l.

<120> VACUNAS QUE INCLUYEN FRAGMENTOS DE NadA MENINGOCÓCICA PARA PROTECCIÓN AMPLIA CONTRA LINAJES HIPERVIRULENTOS

5 <130> P055397EP

<140> EP-10____._

<141> 2003-10-02

<150> EP-03758486.9

<151> 2003-10-02

10 <150> PCT/IB03/04848

<151> 2003-10-02

<150> GB-0309115.4

<151> 2003-04-22

<150> GB-0305831.0

15 <151> 2003-03-13

<150> GB-0223741.0

<151> 2002-10-11

<160> 12

<170> SeqWin2010, version 1.0

20 <210> 1

<211> 350

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

ES 2 608 048 T3

Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys
 20 25 30
 Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile
 35 40 45
 Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly
 50 55 60
 Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp
 65 70 75 80
 Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr
 85 90 95
 Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu
 100 105 110
 Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala
 115 120 125
 Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn

ES 2 608 048 T3

130						135										140
Lys	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Phe	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Thr	Asn	
145					150					155					160	
Ile	Val	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Val	Asp	
				165					170					175		
Lys	His	Ala	Glu	Ala	Phe	Asn	Asp	Ile	Ala	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Thr	
			180					185					190			
Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Asn	Glu	Ala	Lys	Gln	
		195					200					205				
Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	
	210					215						220				
Glu	Thr	Ala	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Asn	Thr	
225					230					235					240	
Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Asp	Ile	Lys	
				245					250					255		
Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys	Asp	Asn	Ile	Ala	Lys	Lys	Ala	Asn	Ser	
			260					265					270			
Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Val	Arg	Ile	
		275					280					285				
Asp	Gly	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Leu	Asp	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser	
	290					295					300					
Ala	Glu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp	His	Asp	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Asp	
305					310					315					320	
Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Leu	Ala	Glu	
				325					330					335		
Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly			
			340					345					350			

<210> 2

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

ES 2 608 048 T3

<400> 2
Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala
1 5 10 15
Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu
20 25 30
Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala
35 40 45
Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys
50 55 60
Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn
65 70 75 80

ES 2 608 048 T3

Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr
85 90 95

Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala
100 105 110

Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr
115 120 125

Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys
130 135 140

Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn
145 150 155 160

Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala
165 170 175

Val Lys Thr Ala Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln
180 185 190

Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala
210 215 220

Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys
225 230 235 240

Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu
245 250 255

Glu Ser Asp Ser Lys Phe Val Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr
260 265 270

Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp
275 280 285

His Asp Thr Arg Leu Asn Gly Leu Asp Lys Thr Val Ser Asp Leu Arg
290 295 300

Lys Glu Thr Arg Gln Gly Leu Ala Glu Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu
305 310 315 320

Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly
325

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

ES 2 608 048 T3

<400> 3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
 20 25 30
 Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 35 40 45
 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His
 85 90 95
 Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His
 100 105 110
 Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala
 115 120 125
 Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr
 130 135 140
 Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr
 145 150 155 160
 Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His
 165 170 175
 Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys
 180 185 190
 Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn
 195 200 205
 Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala
 210 215 220
 Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg
 225 230 235 240
 His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 245

<210> 4

<211> 179

ES 2 608 048 T3

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 4

```

Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala Val
 1          5          10          15
Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala Leu
 20          25          30
Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr
 35          40          45
Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asn Arg His Leu
 50          55          60
Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly
 65          70          75
Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile
          85          90          95
Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr
 100          105          110
Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala
 115          120          125
Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val
 130          135          140
Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val
 145          150          155
Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr
 165          170          175

Val Gln Arg

```

5 <210> 5

<211> 168

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 5

ES 2 608 048 T3

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

<210> 6

<211> 464

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 6

ES 2 608 048 T3

Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro
1 5 10 15
Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala
20 25 30
Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met
35 40 45
Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala
50 55 60
Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln
65 70 75 80
Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro
85 90 95
Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu
100 105 110
Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly
115 120 125
Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr
130 135 140
Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser
145 150 155 160
Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser
165 170 175
Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro
180 185 190
Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly
195 200 205
Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys
210 215 220
Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn
225 230 235 240
Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile
245 250 255
Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg
260 265 270
Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro
275 280 285
Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala
290 295 300
Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn
305 310 315 320

ES 2 608 048 T3

Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr
 325 330 335
 Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly
 340 345 350
 Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly
 355 360 365
 Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly
 370 375 380
 Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met
 385 390 395 400
 Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly
 405 410 415
 Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly
 420 425 430
 Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp
 435 440 445
 Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 450 455 460

<210> 7

<211> 644

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 7

ES 2 608 048 T3

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
1 5 10 15

Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro
20 25 30

Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln
35 40 45

Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
50 55 60

Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
65 70 75 80

Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
85 90 95

Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala
100 105 110

Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala
115 120 125

Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly
130 135 140

Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala

ES 2 608 048 T3

145 150 155 160
Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser
165 170 175
Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
180 185 190
Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
195 200 205
Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe
210 215 220
Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly
225 230 235 240
Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser
245 250 255
Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys
260 265 270
Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
275 280 285
Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
290 295 300
Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile
305 310 315 320
Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
325 330 335
Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys
340 345 350
Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
355 360 365
Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala
370 375 380
Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
385 390 395 400
Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
405 410 415
Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
420 425 430
Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
435 440 445
Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
450 455 460
Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys
465 470 475 480

ES 2 608 048 T3

Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495

Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510

Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
 515 520 525

Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540

Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
 545 550 555 560

Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
 565 570 575

Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
 580 585 590

Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
 595 600 605

Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620

Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640

Ala Ala Lys Gln

<210> 8

<211> 434

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 8

ES 2 608 048 T3

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

ES 2 608 048 T3

Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr
 130 135 140

Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys
 145 150 155 160

Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn
 165 170 175

Tyr Val Gln Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly
 180 185 190

Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys
 195 200 205

Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys
 210 215 220

Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp
 225 230 235 240

Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp
 245 250 255

Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser
 260 265 270

Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe
 275 280 285

Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala
 290 295 300

Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe
 305 310 315 320

Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe
 325 330 335

Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala
 340 345 350

Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu
 355 360 365

Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His
 370 375 380

Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser
 405 410 415

Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala
 420 425 430

Lys Gln

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligador

5 <400> 9

Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 10

<211> 255

<212> PRT

10 <213> Neisseria meningitidis

<400> 10

ES 2 608 048 T3

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
 20 25 30
 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
 35 40 45
 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
 50 55 60
 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
 65 70 75 80
 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
 85 90 95
 Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu
 100 105 110
 Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
 115 120 125
 Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
 130 135 140
 Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
 145 150 155 160
 Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
 165 170 175
 Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp
 180 185 190
 Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile
 195 200 205
 Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
 210 215 220
 Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
 225 230 235 240
 Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 245 250 255

<210> 11

<211> 254

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 11

ES 2 608 048 T3

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
 20 25 30
 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
 35 40 45
 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
 50 55 60
 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
 65 70 75 80
 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
 85 90 95
 Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu
 100 105 110
 Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser
 115 120 125
 Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
 130 135 140
 Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp
 145 150 155 160
 Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
 165 170 175
 His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 180 185 190
 Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 12

<211> 262

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

ES 2 608 048 T3

<400> 12

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys
 20 25 30
 Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn
 35 40 45
 Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala
 50 55 60
 Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr
 85 90 95
 Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asn His Ser
 100 105 110
 Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Thr
 115 120 125
 Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly
 130 135 140
 Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu Tyr His
 145 150 155 160
 Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser
 165 170 175
 Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys
 180 185 190
 Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp
 195 200 205
 Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu
 210 215 220
 Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile
 245 250 255
 Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 260

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende cinco antígenos meningocócicos:

(1) una proteína NadA que es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(2) una proteína 741 que tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID NO: 3;

5 (3) una proteína 936 que tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID NO: 4;

(4) una proteína 953 que tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID NO: 5; y

(5) una proteína 287 que tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID NO: 6.

10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende un polipéptido de fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que: X es una secuencia de aminoácidos de uno de los cinco antígenos (1) a (5); L es una secuencia de aminoácidos ligadora opcional; A es una secuencia de aminoácidos N terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos C terminal opcional; y n es 2, 3, 4 o 5.

3. La composición de la reivindicación 2, en la que: (a) n es 2, X1 es la proteína 936 como se define en la reivindicación 1 y X2 es la proteína 741 como se define en la reivindicación 1; y/o (b) n es 2, X1 es la proteína 287 como se define en la reivindicación 1 y X2 es la proteína 953 como se define en la reivindicación 1.

15 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende (a) una proteína que comprende la SEQ ID NO: 7 y/o (b) una proteína que comprende la SEQ ID NO: 8.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) del serogrupo B de *N.meningitidis*.