

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 098**

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 10181233 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2353608**

54 Título: **Vacunas de polipéptidos 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:

23.07.2020

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)

Rue de l'Institut 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

PIZZA, MARIAGRAZIA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 775 098 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 de polipéptidos para protección amplia contra linajes meningocócicos hipervirulentos

5 CAMPO TÉCNICO

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

10 TÉCNICA ANTERIOR

15 *N. meningitidis* es un patógeno humano gramnegativo y no móvil que coloniza la faringe y produce meningitis (y, en ocasiones, septicemia en ausencia de meningitis). Produce enfermedad tanto endémica como epidémica. Tras la introducción de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae*, *N. meningitidis* es la principal causa de meningitis bacteriana en EE.UU.

20 Basándose en el polisacárido capsular del organismo se han identificado varios serogrupos de *N. meningitidis*. El serogrupo A es el patógeno implicado con mayor frecuencia en la enfermedad epidémica en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la gran mayoría de los casos en EE.UU. y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en EE.UU. y en los países desarrollados. Después del serogrupo, la clasificación incluye el serotipo, el serosubtipo y, después, el inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera 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 producen enfermedad a menudo (hiperinvasiva), algunos linajes producen formas más graves de la enfermedad que otros (hipervirulentos) y otros rara vez producen enfermedad. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, a saber los subgrupos I, III y IV-1, el complejo ET-5, el complejo ET-37, el clúster A4 y el linaje 3. Éstos se han definido mediante electroforesis enzimática de multilocus (MLEE), pero también se ha usado el tipado de secuencias en multilocus (MLST) para clasificar los meningococos [ref. 1].

30 Durante muchos años se ha conocido una vacuna polisacárida contra los serogrupos A, C, W135 e Y [2,3], pero no se ha podido preparar una vacuna contra el serogrupo B. Se han probado vacunas basadas en vesículas de membrana externa [p. ej., véase la ref. 4], pero la protección conferida por estas vacunas normalmente está restringida a la cepa usada para fabricar la vacuna. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de una vacuna contra el serogrupo B ampliamente eficaz.

35 Se han notificado las secuencias genómicas de los serogrupos de meningococos A [5] y B [6,7] y se ha estudiado la secuencia del serogrupo B para identificar los antígenos vacunales [p. ej., ref. 8 a13]. Los antígenos candidatos se han manipulado para mejorar la expresión heteróloga [ref. 14 a 16].

40 Es un objeto de la invención proporcionar más y mejores composiciones para conferir inmunidad contra la enfermedad y/o infección meningocócicas, y, en particular, para conferir amplia inmunidad contra el meningococo de serogrupo B.

45 DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

50 Las vacunas contra patógenos tales como el virus de la hepatitis B, difteria y tétanos normalmente contienen un único antígeno proteico (p. ej., el antígeno de superficie del VHB o el toxoide del tétanos). En contraste con esto, las vacunas celulares contra la tos ferina contienen al menos tres proteínas de *B. pertussis* y la vacuna neumocócica Prevenar™ contiene siete antígenos sacáridos conjugados distintos. Otras vacunas tales como las vacunas celulares contra pertussis, la vacuna contra el sarampión, la vacuna de la polio con virus inactivados (IPV) y las vacunas OMV meningocócicas son, por su propia naturaleza, mezclas complejas de un gran número de antígenos.

55 Por tanto, si la protección puede ser provocada por un único antígeno, un número pequeño de antígenos definidos o una mezcla compleja de antígenos indefinidos depende del patógeno en cuestión. La invención se basa en el descubrimiento de que un número pequeño de antígenos definidos es capaz de conferir amplia protección contra la infección por meningococos y la invención proporciona una composición que, después de su administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en dicho sujeto, en el que la respuesta de anticuerpos es bactericida contra dos o más (p. ej., 2 ó 3) linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 del serogrupo B de *N. meningitidis*.

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

65

Para el meningococo del serogrupo B, se ha encontrado que una mezcla de cinco antígenos proteicos definidos provoca una buena respuesta inmunitaria protectora. Por tanto, la invención proporciona una composición que comprende los siguientes cinco antígenos proteicos meningocócicos como se define en la reivindicación 2; (1) una proteína "NadA"; (2) una proteína "741"; (3) una proteína "936"; (4) una proteína "953" y (5) una proteína "287" tal como se define en las reivindicaciones. Estos antígenos se denominan en la presente memoria descriptiva los "cinco antígenos básicos".

Proteína NadA

La proteína "NadA" (adhesina A de Neisseria) del serogrupo B de *N. meningitidis* se divulga como proteína "961" en la referencia 10 (SEC ID 2943 y 2944) y como "NMB1994" en la referencia 6 (véase también los números de acceso en GenBank: 11352904 & 7227256). Una descripción detallada de la proteína se puede encontrar en la referencia 17. No existe la proteína correspondiente en el serogrupo A [5, 17].

Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la NadA está en forma trimérica y consiste de la secuencia de aminoácidos SC ID 2. Otras formas de NadA son variantes de truncamiento o delección, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se prefiere la NadA sin su anclaje a la membrana por el extremo C (p. ej., delección de los residuos 351-405 para la cepa 2966 [SEC ID 1]) que, en ocasiones, se distingue en la presente memoria descriptiva mediante el uso de una "C" en superíndice, por ejemplo NadA^(C). La expresión de NadA sin su dominio de anclaje a la membrana (p. ej., SEC ID 1) en *E. coli* tiene como resultado la secreción de la proteína en el sobrenadante del cultivo con la eliminación concomitante de su péptido líder 23mer (p. ej., para dejar un 327mer para la cepa 2996 [SEC ID 2]). En la presente memoria descriptiva en ocasiones los polipéptidos sin sus péptidos líder se distinguen mediante el uso de un "NL" en superíndice, p. ej., NadA^(NL) o NadA^{(C)(NL)}.

Otras secuencias de NadA tienen una identidad del 50% o mayor (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 2. Esto incluye variantes de NadA (p. ej., variantes alélicas, homólogos, ortólogos, mutantes etc.). Formas alélicas de NadA se muestran en la Figura 9 de la referencia 18.

Otras secuencias de NadA comprenden al menos *n* aminoácidos consecutivos de la SEC ID 1, en la que *n* es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epítipo de NadA. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o del extremo N de la SEC ID 1 (p. ej., NadA^(C), NadA^(NL), NadA^{(C)(NL)}). Cuando se delecionan los residuos del N terminal, se prefiere que la delección no elimine la capacidad de la NadA para adherirse a células epiteliales humanas.

La NadA secretada puede prepararse de forma conveniente en forma altamente pura a partir del sobrenadante del cultivo mediante un procedimiento que comprende las etapas de: Concentración y diafiltración contra un tampón mediante ultrafiltración; cromatografía en columna aniónica; cromatografía en columna hidrofóbica; cromatografía en columna cerámica de hidroxilapatita; diafiltración contra un tampón; y esterilización con filtro. Detalles adicionales del procedimiento se proporcionan en los ejemplos.

La NadA se usa, preferentemente, en forma oligomérica (p. ej., en forma trimérica).

Proteína 741

La proteína "741" del serogrupo B se divulga en la referencia 10 (SEC ID 2535 y 2536) y como "NMB1870" en la referencia 6 (véase también el número de acceso en GenBank GI:7227128). La proteína correspondiente en el serogrupo A [5] tiene un número de acceso en GenBank 7379322. La 741 es en su forma natural una lipoproteína.

Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 741 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de 741 variantes truncadas o con delecciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede deleccionar el extremo N de la 741 hasta, e incluida, su secuencia de poli-glicina (es decir, delección de residuos 1 a 72 para la cepa MC58 [SEC ID 3]), que, en ocasiones, se distingue en la presente memoria descriptiva mediante el uso de un prefijo "ΔG". Esta delección puede potenciar la expresión. La delección también elimina el sitio de lipidación de la 741.

Las secuencias de 741 tienen una identidad del 85% o mayor (p. ej., 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 3. Esto incluye variantes de 741 (p. ej., variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes etc.). Las formas alélicas se pueden encontrar en las SEC ID 1 a 22 de la referencia 16 y en las SEC ID 1 a 23 de la referencia 19, las SEC ID 1-299 de la referencia 20 se proporcionan otras secuencias de 741.

Otras secuencias de 741 comprenden al menos *n* aminoácidos consecutivos de la SEC ID 3, en la que *n* es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 741. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (p. ej., 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la SEC ID 3.

La proteína 741 es un antígeno extremadamente eficaz para provocar respuestas de anticuerpos anti-meningococo y se expresa en todos los serogrupos de meningococos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos y que uno de estos se divide de nuevo para dar tres variantes en total [21] y, aunque el suero producido contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo variante, no es activo contra cepas que expresan una de las otras dos variantes, *es decir* existe una protección cruzada dentro de la variante pero no hay una protección cruzada entre variantes. Para una máxima eficacia cruzada entre cepas se prefiere que una composición incluya más de una variante de la proteína 741. Una secuencia de ejemplo de cada variante se proporciona en las SEC ID 10, 11 y 12 en la presente memoria descriptiva, comenzando con un residuo de cisteína en el extremo N al que se unirá de forma covalente un lípido en la forma de lipoproteína de 741.

Por tanto, se prefiere que la composición incluya al menos dos de: (1) una primera proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un *a*% de identidad de secuencia con la SEC ID 10 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos *x* aminoácidos contiguos de la SEC ID 10; (2) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un *b*% de identidad de secuencia con la SEC ID 11 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos *y* aminoácidos contiguos de la SEC ID 11; y (3) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un *c*% de identidad de secuencia con la SEC ID 12 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos *z* aminoácidos contiguos de la SEC ID 12.

El valor de *a* es al 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 al 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 al 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 están intrínsecamente relacionados entre sí.

El valor de *x* es al 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 *y* es al 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 al 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 están intrínsecamente relacionados entre sí.

Se prefiere que cualquier secuencia de aminoácidos de 741 no entre dentro de más de una de las categorías (1), (2) y (3). Por tanto, cualquier secuencia de 741 entrará en sólo una de las categorías (1), (2) y (3). Por tanto, se prefiere que: la proteína (1) tenga menos que un *i*% de identidad de secuencia con la proteína (2); la proteína (1) tenga menos que un *j*% de identidad de secuencia con la proteína (3); y que la proteína (2) tenga menos que un *k*% de identidad de secuencia con la proteína (3). El valor de *i* es 60 o más (*p. ej.*, 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 máximo, *a*. El valor de *j* es 60 o más (*p. ej.* 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 máximo, *b*. El valor de *k* es 60 o más (*p. ej.* 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 máximo, *c*. Los valores de *i*, *j* y *k* no están relacionados intrínsecamente entre sí.

Proteína 936

La proteína "936" del serogrupo B se divulga en la referencia 10 (SEC ID 2883 y 2884) y como "NMB2091" en la referencia 6 (véase también el número de acceso en GenBank). 7227353). El correspondiente gen en el serogrupo A [5] tiene un número de acceso en GenBank 7379093.

Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 936 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de 936 son variantes truncadas o con deleciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede deleccionar el péptido líder del extremo N de 936 (*es decir*, deleción de los residuos 1 a 23 para la cepa MC58 [SEC ID 4]), para dar 936^(NL).

Las secuencias de 936 tienen una identidad del 85% o mayor (*p. ej.*, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 4. Esto incluye variantes de 741 (*p. ej.*, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes *etc.*).

Otras secuencias de 936 comprenden al menos *n* aminoácidos consecutivos de la SEC ID 4, en la que *n* es 7 o más (*p. ej.*, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epitopo de 936. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (*p. ej.*, 1, 2, 4, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la SEC ID 4.

Proteína 953

La proteína "953" del serogrupo B se divulga en la referencia 10 (SEC ID 2917 y 2918) y como "NMB1030" en la referencia 6 (véase también el número de acceso en GenBank GI:7226269). La proteína correspondiente en el serogrupo A[5] tiene un número de acceso en GenBank 7380108.

Cuando se usa, la proteína 953 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de 953 son variantes truncadas o con deleciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede deleccionar el péptido líder del extremo N de 953 (*es decir*, deleción de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58 [SEC ID 5]), para dar 953^(NL).

Las secuencias de 953 tienen una identidad del 85% o mayor (p. ej., 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 5. Esto incluye variantes de 953 (p. ej., variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes *etc.*). Formas alélicas de 953 se muestran en la Figura 19 de la referencia 12.

Otras secuencias de 953 comprenden al menos *n* aminoácidos consecutivos de la SEC ID 5, en la que *n* es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos comprenden un epítipo de 953. Otros fragmentos carecen de uno o más aminoácidos (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la SEC ID 5.

Proteína 287

La proteína "287" del serogrupo B se divulga en la referencia 10 (SEC ID 3103 y 3104) y como "NMB2132" en la referencia 6 y como "GNA2132" en la referencia 13 (véase también el número de acceso en GenBank GI:7227388). La proteína correspondiente en el serogrupo A[5] tiene un número de acceso en GenBank 7379057.

Cuando se usa, la proteína 287 puede tomar varias formas. Las formas de 287 son variantes truncadas o con deleciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede deleccionar el extremo 287 hasta, e incluida, su secuencia de poli-glicina (*es decir*, deleción de residuos 1 a 24 para la cepa MC58 [SEC ID 6]), que, en ocasiones, se distingue en la presente memoria descriptiva mediante el uso de un prefijo "ΔG". Esta deleción puede potenciar la expresión.

Las secuencias de 287 tienen una identidad del 85% o mayor (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 6. Esto incluye variantes de 287 (p. ej., 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 la figura 21 de la referencia 10 (SEC ID 3179 a 3184).

Otras secuencias de 287 comprenden al menos *n* aminoácidos consecutivos de la SEC ID 6, en la que *n* es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 287. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la SEC ID 6.

Proteínas de fusión

Los cinco antígenos pueden estar presentes en la composición como cinco proteínas distintas, pero se prefiere que al menos dos de los antígenos se expresen en forma de una única cadena polipeptídica (una proteína "híbrida" [ref. 14 a 16]), por ejemplo de modo que los cinco antígenos formen menos de cinco polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas principales: En primer lugar, a una proteína que puede ser inestable o poco expresada por sí misma se le puede ayudar añadiendo una pareja híbrida adecuada que supere el problema; en segundo lugar, la fabricación comercial se simplifica, ya que sólo se necesita realizar una expresión y purificación con el fin de producir dos proteínas útiles por separado.

Una proteína híbrida incluida en una composición de la invención puede comprender dos o más (*es decir*, 2, 3, 4 ó 5) de los cinco antígenos básicos. Se prefieren los híbridos constituidos por dos de los cinco antígenos básicos.

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. No obstante, se prefiere que un antígeno esté presente en forma de híbrido o en forma de no híbrido, pero no como ambos, aunque puede ser útil incluir la proteína 741 tanto como antígeno híbrido como en forma de no híbrido (preferentemente lipoproteína), particularmente cuando se usa más de una variante de 741.

Híbridos de dos antígenos para usar 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 de dos antígenos preferidos comprenden: 741 y 936; 953 y 287.

Las proteínas híbridas se pueden representar con la fórmula **NH₂-A-[-X-L-]_n-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 opcional en el extremo N; B es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo C; y n es 2, 3, 4 ó 5.

Si un resto X tiene una secuencia de péptido líder en su forma salvaje, esta se puede incluir u omitir en la proteína híbrida. En algunas formas de realización, los péptidos líder se delecionarán a excepción por el del resto -X- localizado en el extremo N de la proteína híbrida, es decir el péptido líder de X₁ se conservará, pero los péptidos líder de X₂...X_n se omitirán. Esto es equivalente a eliminar todos los péptidos líder y usar el péptido líder de X₁ como resto -A-.

Para n casos de [-X-L-], la secuencia de aminoácidos ligadora -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando N=2 el híbrido puede ser NH₂-X₁- L₁-X₂- L₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-COOH, NH₂-X₁- L₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-X₂- L₂-COOH, etc. La(s) secuencia(s) de aminoácidos ligadora(s) -L- normalmente serán cortas (p. ej., de 20 o menos aminoácidos, es decir 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos comprenden secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, ligadores de poli-glicina (es decir, que comprenden Gly_n, donde n= 2,3,4,5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) y marcajes de histidinas (es decir, His_n, donde n= 3,4,5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos ligadoras serán evidentes para los expertos en la técnica. Un ligador útil es GSGGGG (SEC ID 9), formándose el dipéptido Gly-Ser a partir de un sitio de restricción de *BamHI*, de modo que ayuda a la clonación y manipulación, y siendo el tetrapéptido (Gly)₄ un ligador de poli-glicina típico. Si X_{n+1} es una proteína ΔG y L_n es un ligador de glicina, éste puede ser equivalente a X_{n+1} no siendo una proteína ΔG y estando L_n ausente.

-A- es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo N. Esta normalmente será corta (p. ej., de 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 peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (p. ej., marcas de histidina, es decir His_n, donde n= 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos en el extremo N adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Si X₁ carece se su propia metionina en el extremo N, -A- es, preferentemente, un oligopéptido (p. ej., con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) que proporciona una metionina en el extremo N.

-B- es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo C. Esta normalmente será corta (p. ej., de 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 peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (p. ej., que comprenden marcas de histidina, es decir His_n, donde n= 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) o secuencias que potencian la estabilidad proteica. Otras secuencias de aminoácidos adecuadas en el extremo C serán evidentes para los expertos en la técnica.

Más preferentemente, 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 una 953.

Dos proteínas híbridas particularmente preferidas de la invención son las siguientes:

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

Estas dos proteínas se usan en combinación con NadA (particularmente con la SEC ID 2).

El híbrido 936-ΔG741 puede prepararse de forma conveniente en forma altamente pura a partir de la expresión en *E. coli* mediante un procedimiento que comprende las etapas de: homogeneización; centrifugación; cromatografía en columna catiónica; cromatografía en columna aniónica; cromatografía en columna hidrofóbica; diafiltración contra un tampón; y esterilización en filtro. Detalles adicionales del procedimiento se proporcionan en los ejemplos.

Secuencias

La divulgación proporciona un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID 1 a 8. También proporciona polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID 1 a 8. Como se ha descrito con anterioridad, el grado de identidad de secuencia es, preferentemente, superior al 50%

(p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más).

La divulgación también proporciona un polipéptido que comprende un fragmento de una secuencia de NadA de *N. meningitidis*, en la que dicho fragmento conserva la capacidad de NadA para adherirse a células epiteliales humanas. Por tanto, se prefieren los fragmentos que conservan los aminoácidos 24-87 de NadA de longitud completa. Los fragmentos preferidos carecen del péptido líder en el extremo N de dicha NadA y/o el dominio de anclaje a la membrana en el extremo C de dicha NadA. La presente invención no incluye dentro de su alcance ninguno de los fragmentos de NadA divulgados en la técnica anterior, *por ejemplo* en las referencias 6 a 18. Con referencia a la NadA de longitud completa [17], la SEC ID 1 carece del dominio de anclaje a la membrana y la SEC ID 2 carece del péptido líder.

La divulgación también proporciona ácido nucleico que codifica dichos polipéptidos. Además, se proporciona ácido nucleico que puede hibridar con este ácido nucleico, preferentemente en condiciones de "alta rigurosidad" (p. ej., 65°C en una solución de 0,1 x SSC, 0,5% SDS).

Los polipéptidos de la invención se pueden preparar por varios medios (*p. ej.*, expresión recombinante, purificación en cultivo celular, síntesis química (al menos en parte), *etc.*) y en varias formas (p. ej., nativa, de fusión, no glicosiladas, lipidadas, *etc.*). Preferentemente se preparan en forma sustancialmente pura (*es decir*, sustancialmente libre de otras proteínas de *N. meningitidis* o de células huésped.).

El ácido nucleico de acuerdo con la invención se puede preparar de muchos modos (*p. ej.*, síntesis química (al menos en parte), a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, a partir del propio organismo, *etc.*) y puede tomar varias formas (*p. ej.*, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas *etc.*). Preferentemente se preparan en forma sustancialmente pura (*es decir*, sustancialmente libre de otros ácidos nucleicos de *N. meningitidis* o de células huésped.). El término "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen estructuras modificadas (p. ej., fosforotioatos *etc.*), así como ácidos nucleicos de péptidos (PNA) *etc.* La invención incluye secuencias que comprenden ácido nucleico complementarias a las descritas con anterioridad (p. ej., para fines de antisentido o de sondaje).

La divulgación también se proporciona un proceso para producir un polipéptido, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped con ácido nucleico en condiciones que inducen la expresión del polipéptido.

La divulgación proporciona un proceso para producir un polipéptido de la invención, que comprende la etapa de sintetizar por lo menos parte del polipéptido por medios químicos.

La divulgación proporciona un proceso para producir ácido nucleico de la invención, que comprende la etapa de amplificar ácido nucleico usando un método de amplificación basado en cebador (por ejemplo, PCR).

La divulgación proporciona un proceso para producir ácido nucleico de la invención, que comprende la etapa de sintetizar por lo menos parte del ácido nucleico por medios químicos.

Cepas

Las proteínas preferidas comprenden una secuencia de aminoácidos que se encuentra en el serogrupo B de *N. meningitidis*. Dentro del serogrupo B, las cepas preferidas son 2996, MC58, 95N477 y 394/98. La cepa 394/98 en ocasiones se denomina, en la presente memoria descriptiva, "NZ", ya que es una cepa de Nueva Zelanda.

Preferentemente, la proteína 287 procede de la cepa 2996 o, más preferentemente, de la cepa 394/98.

Preferentemente, la 741 procede de las cepas del serogrupo B MC58, 2996, 394/98 o 95N477, o de la cepa del serogrupo C 90/18311. La cepa MC58 es más preferida.

Las proteínas 936, 953 y NadA proceden, preferentemente, de la cepa 2996.

Las cepas pueden indicarse en forma de subíndice, por ejemplo, la 741_{MC58} es la proteína 741 de la cepa MC58. A menos que se indique lo contrario, las proteínas mencionadas en la presente memoria descriptiva (*p. ej.*, sin subíndice) proceden de la cepa 2996 de *N. meningitidis*, que se puede tomar como cepa "de referencia". No obstante, se apreciará que la invención no está, en general, limitada por la cepa. Como se ha mencionado con anterioridad, las referencias generales a una proteína (p. ej., "287", "919" *etc.*) pueden tomarse de modo que incluyan la proteína de cualquier cepa. Normalmente, esta tendrá una identidad de secuencia con 2996 del 9% o más (*p. ej.*, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 99% o más).

Cuando una composición incluye un antígeno proteico concreto (*p. ej.*, 741 o 287), la composición puede incluir dicho antígeno en más de una forma variante, por ejemplo la misma proteína, pero procedente de más de una cepa. Estas proteínas se pueden incluir en forma de proteínas en tándem o por separado.

5 Cuando se usan proteínas híbridas, los antígenos individuales dentro del híbrido (es decir, los restos -X- individuales) pueden proceder de una o más cepas. Cuando $n=2$, por ejemplo, X_2 puede proceder de la misma cepa que X_1 o de una cepa diferente. Cuando $n=3$, las cepas podrían 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 bactericidas de anticuerpos

10 En general, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos después de su administración a un sujeto. Estas respuestas se miden de forma conveniente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [p. ej., véase la nota al final 14 de la referencia 13]. La actividad bactericida en suero (ABS) mide la muerte de bacterias mediada por el complemento y se puede analizar usando complemento humano o de cachorro de conejo. Las normas de la OMS requieren que una vacuna induzca al menos una elevación multiplicada por 4 de la ABS en más del 90% de los receptores.

15 En lugar de ofrecer una protección estrecha, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra más de un linaje hipervirulento del serogrupo B. En particular, pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra dos o tres de los siguientes tres linajes hipervirulentos: (i) clúster A4; (ii) complejo ET-5; y (iii) linaje 3. Adicionalmente pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra uno o más linajes hipervirulentos del subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y contra otros linajes, *por ejemplo* linajes hiperinvasivos.

20 Esto no significa necesariamente que la composición pueda inducir anticuerpos bactericidas contra toas u cada una de las cepas de meningococo del serogrupo B en estos linajes hipervirulentos, por ejemplo, en su lugar, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas del meningococo del serogrupo B en un linaje hipervirulento concreto, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos el 50% (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos de cepas preferidos incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los países siguientes: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. Preferentemente, el suero tiene un título bactericida de al menos 1024 (p. ej., 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o mayor, preferentemente al menos 2^{14}), es decir, el suero puede matar al menos el 50% de las bacterias de ensayo de una cepa concreta cuando está diluida al 1/1024, como se describe en la referencia 13.

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

30 Las cepas 561-5945 y G2136 son las dos cepas de referencia de *Neisseria* MLST [ids 638 y 1002 en la referencia 22]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (p. ej., ATCC BAA-335) y era la cepa que se secuenció en la referencia 6. La cepa 44/76 se ha usado ampliamente y se ha caracterizado (p. ej., ref. 23 y es una de las cepas de referencia *Neisseria* MLST [id 237 en la referencia 22; fila 32 de la Tabla 2 en la referencia 1]. Originalmente, la cepa 394/98 se aisló en Nueva Zelanda en 1998 y se han publicado varios estudios usando esta cepa (p. ej., ref. 24 y 25). La cepa BZ 198 es otra cepa de referencia MLST [id 409 en la referencia 22; fila 41 de la Tabla 2 en la referencia 1-]. La composición puede adicionalmente inducir una repuesta bactericida contra la cepa LNP17592 serogrupo W135 (W135:2a: P 1.5,2 del complejo ET-37. Esta es una cepa Haji aislada en Francia en el año 2000.

50 Huésped heterólogo

Aunque la expresión de las proteínas de la invención puede tener lugar en *Neisseria*, la presente invención utiliza, preferentemente, un huésped heterólogo. El huésped heterólogo puede ser procarionta (p. ej., una bacteria) o eucariota. Preferentemente es *E. coli*, pero otros huéspedes adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (p.ej., *M. tuberculosis*), levaduras, etc

60 Por tanto, la invención proporciona una composición que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta de anticuerpo en dicho sujeto, en el que la respuesta de anticuerpo es bactericida contra dos o más (p. ej., 2 ó 3) linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 de *N. meningitidis*, serogrupo B, y en el los inmunogenes en la composición que dan lugar a la respuesta de anticuerpo se obtienen mediante expresión recombinante en un huésped que no sea *Neisseria*. Por tanto, los inmunogenes en las composiciones de la invención son, preferentemente, inmunogenes recombinantes. En consecuencia pueden preferirse composiciones que no incluyen preparaciones OMV.

Composiciones y medicamentos inmunogénicos

5 Las composiciones de la invención son inmunogénicas y son, más preferentemente, composiciones vacunales. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser 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, preferentemente, entre 6 y 8, preferentemente de aproximadamente 7. El pH estable se puede mantener mediante el uso de un tampón. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón 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 seres humanos.

15 Las composiciones se pueden presentar en viales o se pueden presentar en jeringas ya cargadas. Las jeringas se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis o múltiples dosis. Normalmente, las composiciones inyectables serán soluciones o suspensiones líquidas. Como alternativa, pueden presentarse en forma sólida (p. ej., liofilizadas) para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

20 Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de monodosis o en forma de múltiples dosis. Para las formas de múltiples dosis se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Se pueden establecer volúmenes de dosificación eficaces de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

25 Cuando una composición de la invención se puede preparar de forma extemporánea antes de usar (p. ej., cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta en forma de kit, el kit puede comprender dos viales o puede comprender una jeringa ya cargada y un vial, usándose los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

30 La divulgación también proporciona una composición de la invención para usar como medicamentos. Preferentemente, el medicamento es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero (*es decir*, es una composición inmunogénica) y es, más preferentemente, una vacuna.

35 La divulgación también proporciona el uso de una composición de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero. También proporciona 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 provocar una respuesta inmune en un mamífero. Preferentemente, el medicamento es una vacuna.

40 La divulgación también proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición de la invención. Preferentemente, la respuesta inmunitaria es protectora y, preferentemente, implica la aparición de anticuerpos. El procedimiento puede provocar una respuesta de refuerzo.

45 Preferentemente, el mamífero es un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es, preferentemente, un niño (p. ej., un niño pequeño o un lactante); cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es, preferentemente, un adulto. Una vacuna destinada a niños puede también administrarse a adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad *etc.*

50 Estos usos y procedimiento son, preferentemente, para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad producida por una *Neisseria* (p. ej., meningitis, septicemia, bacteriemia, gonorrhoea *etc.*). Se prefiere la prevención y/o tratamiento de la meningitis bacteriana o meningocócica.

55 Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por *Neisseria* tras la administración de la composición de la invención. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias contra los cinco antígenos básicos tras la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención se puede determinar mediante su administración a sujetos de ensayo (p. ej., niños de 12-16 meses de edad o modelos animales [27]) y, después, determinando los parámetros estándar, incluidos los anticuerpos bactericidas en suero (ABS) y los títulos de ELISA (GMT) de IgG total y anti-cápsula de alta avidéz. Estas respuestas inmunitarias generalmente se determinarán alrededor de meses después de la administración de la composición y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un incremento de los ABS de al menos 4 u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, se puede realizar más de una determinación postadministración.

65 Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio para seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos

humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado superior a lo que en un huésped se considera seroconversión contra el antígeno son bien conocidos y dichos títulos son publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente, más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertido, más preferentemente más del 90%, todavía más preferentemente más del 93% y, más preferentemente, 96-100%.

En general, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir mediante inyección parenteral (p. ej. por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido) o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o el brazo. La inyección se puede realizar a través de una aguja (p. ej., una aguja hipodérmica) pero, como alternativa, se puede usar la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

La posología del tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. A un calendario de dosis primaria le puede seguir un calendario de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis iniciales (p. ej., entre 4-16 semanas) y entre la administración inicial y la de refuerzo se pueden determinar de forma rutinaria.

Las infecciones con *Neisseria* afectan a varias zonas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención se pueden preparar de varias maneras. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar en forma de inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección (p. ej., una composición liofilizada). La composición se puede preparar para administración tópica, por ejemplo en forma de un ungüento, crema o polvo. La composición se puede preparar para administración oral, por ejemplo en forma de un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para administración pulmonar, *por ejemplo* en forma de un inhalador, usando un polvo fino o un atomizador. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular, *por ejemplo* en forma de atomizador, gotas, gel o polvo [p. ej., referencias 28 y 29]. Se ha notificado el éxito con la administración nasal de sacáridos neumocócicos [30,31], polipéptidos neumocócicos [32], sacáridos de Hib [33], sacáridos de MenC [34] y mezclas de conjugados sacáridos de Hib y MenC [35].

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), así como de cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se quiere decir que la administración de dicha cantidad a un individuo, bien en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía en función de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (p. ej., primate no humano, primate etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico encargado del tratamiento de la situación médica y otros factores relevantes. Cabe esperar que la cantidad entrará dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios y una cantidad típica de cada antígeno sacárido meningocócico 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 (expresados como sacárida).

Otros componentes no antigénicos de la composición

Normalmente, la composición de la invención comprende, además de los componentes mencionados con anterioridad, uno o más "transportadores farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier transportador que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos dañinos para los individuos que reciban la composición. Normalmente, los transportadores adecuados son macromoléculas grandes que se metabolizan despacio, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa [36], trehalosa [37], lactosa y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Dichos transportadores son bien conocidos para los expertos en la técnica. Las vacunas pueden también contener diluyentes tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares. Un transportador típico es la solución salina fisiológica tamponada con fosfato estéril y sin pirógenos. En la referencia 38 se puede encontrar una exhaustiva discusión de excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones pueden incluir un antimicrobiano, particularmente envasado en formato de múltiples dosis.

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

Las composiciones pueden incluir sales de sodio (p. ej., cloruro sódico) para dar tonicidad. Una concentración de 10 ± 2mg/ml de NaCl es típica.

Generalmente, las composiciones incluyen un tampón. Un tampón fosfato es típico.

5 Las composiciones comprenden un alcohol de azúcar (*p. ej.*, manitol) o un disacárido (*p. ej.*, sacarosa o trehalosa), por ejemplo a aproximadamente 15–30 mg/ml (*p. ej.*, 25 mg/ml), particularmente si se van a liofilizar o si incluyen material que se ha reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para liofilización se puede ajustar a aproximadamente 6,1 antes de la liofilización.

10 Las vacunas pueden administrarse junto con otros agentes inmunoreguladores. En particular, las composiciones normalmente incluirán un adyuvante. Los adyuvantes que se pueden usar en las composiciones de la invención incluyen, entre otros:

A. Composiciones que contienen mineral

15 Las composiciones que contienen mineral adecuadas para usar 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 (*p. ej.*, oxihidróxidos), fosfatos (*p. ej.*, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos *etc.* [*p. ej.*, véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia 39] o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (*p. ej.*, gel, cristalina, amorfo, *etc.*) y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que
20 contienen minerales también se pueden formular en forma de una partícula de una sal metálica [40]. Particularmente se prefieren fosfatos de aluminio, particularmente en las composiciones que incluyen un antígeno sacárido de *H. influenzae* y un adyuvante típico es hidroxifosfato aluminio amorfo con una proporción molar de PO₄/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al³⁺/ml. La adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio se puede usar, por
25 ejemplo, entre 50 y 100 µg de Al³⁺ por conjugado por dosis. Cuando hay más de un conjugado en una composición, no todas los conjugados tienen que adsorberse.

B. Emulsiones en aceite

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

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de referencia 39]

35 Las formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos de esteroles y glicósidos de triterpenoide que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies de plantas. La saponina de la
40 corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officianalis* (jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. El QS21 se comercializa como Stimulon™.

45 Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones específicas purificadas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la referencia 42 se divulga un procedimiento de producción de QS21. Las formulaciones de saponina pueden también comprender un esteroles, tal como colesterol [43].

50 Las combinaciones de saponinas y colesterol se pueden usar para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia 39]. Normalmente, los ISCOM también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOM se puede usar cualquier saponina conocida. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen con mayor
55 detalle en las referencias 43-45. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [46].

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

D. Virosomas y partículas similares a virus

60 Los virosomas y partículas similares a virus (VLP) también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Generalmente estas estructuras contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. En general son no patogénicas, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse a partir de virus
65 enteros. Estas proteínas virales adecuadas para usar en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de

la gripe (tal como HA o NA), el virus de la hepatitis B (tal como proteínas del núcleo o de la cápside), el virus de la hepatitis E, el virus del sarampión, el virus Sindbis, rotavirus, el virus de la enfermedad pie-boca, retrovirus, virus de Norwalk, el virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como proteína pl del retrotransposón Ty). Las VLP se tratan con mayor detalle en las referencias 49-54. Los virosomas se tratan con mayor detalle en, por ejemplo, la referencia 55.

E. Derivados de bacterias o microbianos

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

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

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

Oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para usar como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace de fosfato a una guanosina). También se ha demostrado que los ARN de doble cadena y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimuladores.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o de una cadena. Las referencias 61,62 y 63 divulgan posibles sustituciones de análogos, *por ejemplo* sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto de adyuvante de los oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en las referencias 64-69.

La secuencia de CpG puede dirigirse a aTLR9, tal como el motivo GTCGTI o TTCGTT [70], La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como CpG-A ODN, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como CpG-B ODN. CpG-A y CpG-B ODN se tratan en las referencias 71-73. Preferentemente, el CpG es un CpG-A ODN.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente se pueden unir dos secuencias oligonucleotídicas CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 70 & 74-76.

Toxinas bacterianas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de las mismas se pueden usar como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación de ADP destoxificadas tales como adyuvantes de mucosa se describe en la referencia 77 y como adyuvantes parenterales en la referencia 78. La toxina o toxoide está, preferentemente, en forma de holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferentemente la subunidad B no ha mutado. Preferentemente, el adyuvante es una LT mutante destoxificada tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se puede encontrar en las referencias 79-86. Preferentemente, la referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas de ribosilación de ADP indicadas en la referencia 87, específicamente incorporadas en la presente memoria descriptiva en su totalidad por referencia.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos para usar como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (*p. ej.*, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [88], *etc.*) [89], interferones (*p. ej.*, interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico [90] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También se pueden usar como adyuvantes en la invención quitosano y derivados del mismo [91].

H. Micropartículas

Las micropartículas también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 µm de diámetro, y más preferentemente de 500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (p. ej., un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxitúrico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona etc.) con poli(láctido-co-glicólido), opcionalmente tratadas para tener una superficie con carga negativa (p. ej., con SDS) o una superficie con carga positiva (p. ej., con un detergente catiónico, tal como CTAB).

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

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para usar como adyuvantes se describen en las referencias 92-94.

J. Formulaciones de polioxietiléneter y polioxietilénéster

Adyuvantes adecuados para usar en la invención incluyen polioxietiléneteres y polioxietilénésteres [95]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de polioxietilénéster de sorbitano en combinación con un octoxinol [96] así como tensioactivos de polioxietiléneter o éster de alquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [97]. Los polioxietiléneteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: Polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteriléter, polioxietilen-8-esteriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

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

L. Péptidos de muramilo

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

M. Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para usar adyuvantes en la invención incluyen Imiquimod y sus homólogos (p. ej., "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las referencias 100 y 101.

La divulgación también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados con anterioridad. Por ejemplo, las siguientes composiciones adyuvantes se pueden usar en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [102]; (2) una saponina (p. ej., QS21) + un derivado de LPS no tóxico (p. ej., 3dMPL) [103]; (3) una saponina (p. ej., QS21) + un derivado de LPS tóxico (p. ej., 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (p. ej., QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [104]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [105]; (6) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80™, 5% de polímero de bloque-plurónico L121 y thr-MDP, bien microfluidizados en una emulsión en submicrones o agitados en vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande. (7) Sistema adyuvante Ribi™ (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 constituido por monofosforilo lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™) y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se divulgan en el capítulo 7 de la referencia 39.

El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio o de fosfato de aluminio es particularmente preferido y, generalmente, los antígenos se adsorben en estas sales. Preferentemente, el hidróxido de aluminio se evita como adyuvante si la composición incluye un antígeno Hib. Cuando se usa fosfato de aluminio y no se desea que adsorba un antígeno en el adyuvante, se favorece incluyendo iones fosfato libres en solución (p. ej., mediante el uso de un tampón fosfato). La prevención de la adsorción también se puede conseguir seleccionando el pH correcto durante la mezcla de antígeno/adyuvante, un adyuvante con una carga de punto de cero adecuada y un orden adecuado de mezcla de diferentes antígenos en una composición [106].

Otro adyuvante preferido es fosfato cálcico.

Otros antígenos

5 Las composiciones de la invención contienen cinco antígenos de proteínas de meningococos. También pueden incluir otros antígenos, aunque pueden no contener antígenos de proteínas meningocócicas distintos a los cinco antígenos básicos. Otros antígenos para incluir pueden ser, por ejemplo:

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

25 La composición puede comprender uno o más de estos otros antígenos: Normalmente, los antígenos estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno. Se prefiere que la eficacia protectora de los antígenos sacáridos individuales no se elimina al combinarlos, aunque la inmunogenicidad real (p. ej., los títulos en ELISA) se puede reducir.

30 Cuando un antígeno de difteria está incluido en la composición, también se prefiere incluir los antígenos del tétanos y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno del tétanos está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno de pertussis está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y del tétanos. Tales combinaciones de DTP se pueden usar para reconstituir conjugados liofilizados.

35 Cuando se unan un antígeno sacárido o de hidrato de carbono, preferentemente se conjuga con una proteína transportadora con el fin de potenciar la inmunogenicidad (véase más adelante).

40 Los antígenos de proteínas tóxicas se pueden destoxificar cuando sea necesario (p. ej., destoxicación de la toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [115]).

45 Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la composición se puede usar ácido nucleico que codifica el antígeno [p. ej., referencias 121 a 129]. Los componentes proteicos de las composiciones pueden reemplazarse de este modo por un ácido nucleico (preferentemente ADN, p. ej., en forma de un plásmido) que codifica la proteína. De forma similar, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imitan antígenos sacáridos, por ejemplo mimotopos [130] o anticuerpos anti-idiotipo. Estos pueden reemplazar los componentes sacáridos individuales o pueden complementarlos. Como ejemplo, la vacuna puede comprender un péptido imitador del MenC [131] o el polisacárido capsular MENA [132] en lugar del propio sacárido.

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

Serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococo

60 Como se ha mencionado con anterioridad, las vacunas de polisacáridos contra los serogrupos A, C W135 e Y se han conocido durante muchos años. Estas vacunas (MENCEVAX ACWY™ y MENOMUNE™) se basan en los polisacáridos capsulares de los organismos y, aunque son eficaces en adolescentes y adultos, proporcionan una respuesta inmunitaria mala y una duración corta de la protección, y no pueden usarse en lactantes.

65 Al contrario que con los antígenos 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 oligosacáridos conjugados con un transportador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac-C™ usa el polisacárido completo (des-O-acetilado) conjugado con un transportador del toxoide del tétanos.

5 Las composiciones pueden incluir antígenos sacáridos capsulares de uno o más de los serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococos, en las que los antígenos están conjugados a proteína(s) transportadora(s) y/o son oligosacáridos.

10 Una cantidad típica de cada antígeno sacárido de meningococo por dosis está entre 1 µg y 20 µg, *por ejemplo* aproximadamente 1,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg (expresados en forma de sacárido).

15 Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A y C, la proporción (p/p) del sacárido MenA:sacárido MenC puede ser superior a 1 (p. ej., 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 serogrupos C y W135, la proporción (p/p) del sacárido MenY:sacárido MenW135 puede ser superior a 1 (p. ej., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor) y/o que la proporción (p/p) del sacárido MenY:sacárido MenC puede ser inferior a 1 (p. ej., 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o menor). Las proporciones (p/p) preferidas 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 proporciones (p/p) preferidas 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 usar una masa sustancialmente igual de cada sacárido.

25 En general, los sacáridos capsulares se usan en forma de oligosacáridos. Estos se forman de forma conveniente mediante fragmentación del lipopolisacárido capsular purificado (p. ej., mediante hidrólisis), que normalmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

30 La fragmentación de los polisacáridos se realizan, preferentemente, para dar un grado medio final de polimerización (GP) en el oligosacárido inferior a 30 (p. ej., entre 10 y 20, preferentemente de aproximadamente 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferentemente de aproximadamente 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El GP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [134].

35 Si se realiza hidrólisis, se medirá el tamaño del hidrolizado con el fin de eliminar los oligosacáridos de longitud corta [135]. Esto se puede conseguir de varios modos, tales como ultrafiltración seguida por cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior o igual a aproximadamente 6 se eliminan, preferentemente, para el serogrupo A y los inferiores a aproximadamente 4 son preferentemente eliminados para los serogrupos W135 e Y.

40 Los antígenos sacáridos MenC preferidos se divulgan en la referencia 133 y se usan en Menjugate™.

El antígeno sacárido puede modificarse químicamente. Esto es particularmente útil para reducir la hidrólisis para el serogrupo A [136; véase más 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.

45 Cuando una composición de la invención incluye un antígeno sacárido MENA, el antígeno es, preferentemente, un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo en el sacárido nativo se ha/han reemplazado por un grupo de bloqueo [136]. Esta modificación mejora la resistencia a la hidrólisis y significa que el antígeno del serogrupo A se puede almacenar y usar en una formulación líquida en lugar de requerir liofilización.

50 El número de unidades de monosacárido que tienen grupos de bloqueo puede variar. Por ejemplo, todas, o sustancialmente todas, las unidades de monosacárido pueden tener grupos de bloqueo. Como alternativa, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las unidades de monosacárido pueden tener grupos de bloqueo. Al 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 monosacárido pueden tener grupos de bloqueo.

55 Asimismo, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede variar. Por ejemplo, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede ser 1 ó 2. Generalmente, el grupo de bloqueo estará en la posición 4 y/o la posición 3 de las unidades de monosacárido.

60 La unidad de monosacárido terminal puede o no tener un grupo de bloqueo en lugar de su hidroxilo nativo. Se prefiere que conserve un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad de monosacárido terminal con el fin de proporcionar un asa para reacciones adicionales (p. ej., conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos se pueden convertir en grupos amino ((-NH₂ o -NH-E, donde E es un grupo protector de nitrógeno) mediante aminación reductora (usando, por ejemplo, NaBH₃CN/NH₄Cl), y después se puede regenerar una vez que otros grupos hidroxilo se han convertido en grupos de bloqueo.

65

Los grupos de bloqueo para reemplazar los grupos hidroxilo pueden ser directamente accesibles a través de una reacción de derivación del grupo hidroxilo, es decir reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo con otro grupo. Derivados adecuados de grupos hidroxilo que actúan como grupos de bloqueo son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (p. ej., éteres de sililo o éteres de alquilo) y acetales. Algunos ejemplos específicos de dichos grupos de bloqueo son alilo, Aloc, bencilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos de bloqueo que no son directamente accesibles y que reemplazan completamente al grupo hidroxilo incluyen alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, NR¹ R² (R¹ y R² se definen en el párrafo siguiente), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃, CCl₃, etc. Los grupos de bloqueo preferidos son los grupos aceptores de electrones.

Grupos de bloqueo 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 puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados de forma independiente de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o Y es NR¹R²; R¹ y R² se seleccionan de forma independiente de H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆; o R¹ y R² pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂; R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados de forma independiente 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 puede estar opcionalmente sustituido 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, normalmente está sustituido con 1, 2 ó 3 grupos como se ha definido anteriormente. Cuando R¹ y R² están unidos para formar un grupo heterocíclico C₃₋₁₂ saturado, quiere decir que R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (p. ej., C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 ó 2 heteroátomos (tales como N, O o S) aparte del átomo de nitrógeno. Ejemplos de grupos heterocíclicos C₃₋₁₂ saturados son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidínilo y aziridinilo.

Los grupos de bloqueo O-X-Y y -OR³ se pueden preparar a partir de grupos -OH mediante procedimientos de derivación estándar, tal como la reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, etc. Por tanto, el átomo de oxígeno en O-X-Y es, preferentemente, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y en O-X-Y sustituye, preferentemente, al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

Como alternativa, los grupos de bloqueo pueden estar accesibles a través de una reacción de sustitución, tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros procedimientos de preparación de los grupos de bloqueo a partir de grupos hidroxilo son bien conocidos.

Más preferentemente, el grupo de bloqueo es -OC(O)CF₃ [137] o un grupo carbamato OC(O)NR¹ R², en el que R¹ y R² se seleccionan de forma independiente de alquilo C₁₋₆. Más preferentemente, R¹ y R² son ambos metilo, es decir el grupo de bloqueo es -OC(O)NMe₂. Los grupos de bloqueo de carbamato tienen un efecto estabilizador sobre el enlace glicosídico y se pueden preparar en condiciones moderadas.

Los sacáridos MenA modificados preferidos contienen *n* unidades de monosacárido, en las que al menos *h*% de las unidades de monosacárido no tienen grupos -OH en las posiciones 3 y 4. El valor de *h* es 24 o más (p. ej., 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100) y preferentemente es 50 o más. Los grupos -OH ausentes son, preferentemente, grupos de bloqueo como se ha definido anteriormente.

Otros sacáridos MenA modificados preferidos comprenden unidades de monosacárido, en las que al menos *s* de las unidades de monosacárido no tienen -OH en la posición 3 y no tienen -OH en la posición 4. El valor de *s* es al menos 1 (p. ej., 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 -OH ausentes son, preferentemente, grupos de bloqueo como se ha definido anteriormente.

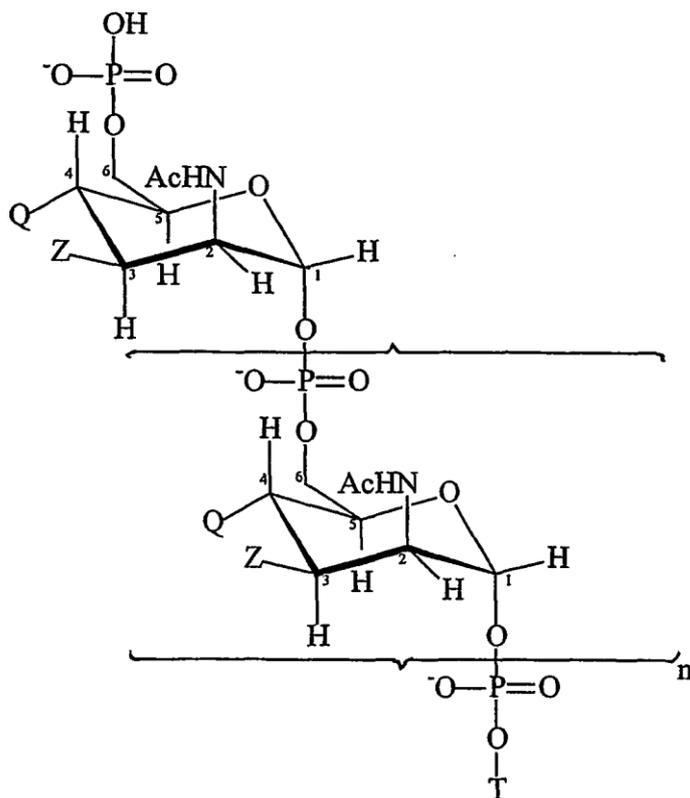
Sacáridos MenA modificados adecuados para usar con la invención tienen la fórmula:

55

60

65

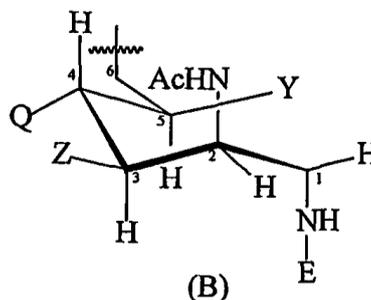
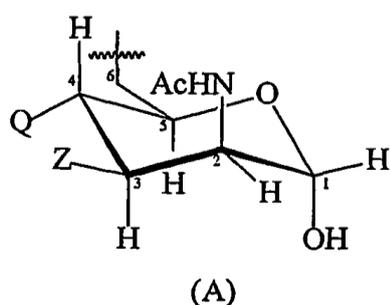
5
10
15
20
25
30



en la que

n es un número entero de 1 a 100 (preferentemente un número entero de 15 a 25);
T es de la fórmula (A) o (B):

35
40
45
50



cada grupo Z se selecciona de forma independiente de OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente; y cada grupo Q se selecciona de forma independiente de OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;
Y se selecciona de OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;
E es H o un grupo protector de nitrógeno;

Y en la que más de aproximadamente 7% (p. ej., 8%, 9%, 10% o más) de los grupos Q son grupos de bloqueo.

Cada uno de los grupos $n+2$ Z pueden ser iguales o diferentes entre sí. Asimismo, cada uno de los grupos $n+2$ Q pueden ser iguales o diferentes entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Como alternativa, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60%, de los grupos Z puede ser OAc. Preferentemente, aproximadamente el 70% de los grupos Z son Oac, siendo el resto de los grupos Z OH o grupos de bloqueo como se ha definido con anterioridad. Al menos aproximadamente el 7% de los grupos Q son grupos de bloqueo. Preferentemente, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los grupos Q son grupos de bloqueo.

Las composiciones preferidas de la invención se pueden almacenar durante 28 días a 37°C y, después de

ese periodo, menos del 1% de la cantidad total inicial del sacárido MENA conjugado estará no conjugado, en la que f es 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o menor.

5 Normalmente, los polisacáridos capsulares meningocócicos se preparan mediante un procedimiento que comprende las etapas de precipitación de polisacárido (p. ej., usando un detergente catiónico), fraccionamiento en etanol, extracción en fenol frío (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar el LPS) [p. ej., referencia 138]. No obstante, un procedimiento más preferido [108] implica precipitación del polisacárido seguida por solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol menor. La precipitación se puede conseguir usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (p. ej., las sales de bromuro) o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Particularmente preferido es el bromuro de cetiltrimetilamonio ("CTAB") [139]. La solubilización del material precipitado se puede conseguir usando un alcohol menor 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. Preferentemente se añade etanol al polisacárido precipitado para dar una concentración final (sobre la base del contenido total de etanol y agua) de entre 50% y 95%. Después de la resolubilización, el polisacárido se puede tratar adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que ni siquiera la menor contaminación es aceptable (p. ej., para la producción de vacunas humanas). Normalmente esto implicará una o más etapas de filtración, por ejemplo filtración en profundo, se puede usar filtración a través de carbón activado, filtración por tamaño y/o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar los contaminantes, el polisacárido se puede precipitar para tratamiento y/o procesamiento adicional. Esto se puede conseguir de forma conveniente intercambiando cationes (p. ej., mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

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

30 Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de al menos dos serogrupos de *N. meningitidis*. Los sacáridos se preparan, preferentemente, por separado (incluida cualquier fragmentación, conjugación, modificación etc.) y después se mezclan para dar una composición de la invención.

35 No obstante, cuando la composición comprende sacárido capsular del serogrupo A se prefiere que el sacárido del serogrupo A no se combine con el(los) otro(s) sacárido(s) hasta poco antes de usar, con el fin de minimizar el potencial de hidrólisis. Esto se puede alcanzar de forma conveniente teniendo el componente del serogrupo A (normalmente junto con los excipientes adecuados) en forma liofilizada y el(los) otro(s) componente(s) del serogrupo en forma líquida (también con los excipientes adecuados), usándose los componentes líquidos para reconstituir el componente de MenA liofilizado cuando se vaya a usar. Cuando se usa una sal de adyuvante como aluminio se prefiere incluir el adyuvante en el vial que contiene con la vacuna líquida y liofilizar el componente MenA sin adyuvante.

40 Por tanto, se puede preparar una composición a partir de un kit que comprende: (a) sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A, en forma liofilizada; y (b) los otros antígenos de la composición en forma líquida. La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición de la invención, que comprende mezclar un sacárido capsular liofilizado de *N. meningitidis* del serogrupo A con los otros antígenos, en la que dichos antígenos están en forma líquida.

45 La divulgación también proporciona un kit que comprende: (a) un primer contenedor que contiene sacáridos capsulares de dos o más *N. meningitidis* de los serogrupos C, W135 e Y, todos en forma liofilizada; y (b) un segundo contenedor que contiene en forma líquida (i) una composición que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta de anticuerpos en dicho sujeto, en el que la respuesta de anticuerpo es bactericida contra dos o más (p. ej., 2 ó 3) linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3 de *N. meningitidis* del serogrupo B, (ii) sacáridos capsulares de ninguno o uno de *N. meningitidis* de los serogrupos C, W135 y Y, y, opcionalmente (iii) otros antígenos (véase más adelante) que no incluyen sacáridos capsulares meningocócicos, en los que la reconstitución de los contenidos del contenedor (a) mediante los contenidos del contenedor (b) proporciona una composición de la invención.

50 En cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual estará, en general, entre 1-50 μg (medidos en masa de sacárido), prefiriéndose aproximadamente 2,5 μg , 5 μg o 10 μg de cada uno. Con proporciones en peso :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 tanto, la cantidad representada por la figura 1 es, preferentemente, de aproximadamente 2,5 μg , 5 μg o 10 μg . Para una proporción 1: 1: 1: 2 de la composición A:C:W:Y y 10 μg por sacárido, se administran 40 μg por dosis. Las composiciones preferidas tienen aproximadamente los siguientes μg de sacárido por dosis:

65

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

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

Los conjugados Menjugate™ y NeisVac™ MenC usan un adyuvante hidróxido, mientras que Meningitec™ usa un fosfato. Es posible en las composiciones de la invención adsorber algunos antígenos sobre un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos asociados con un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes de serogrupos, por ejemplo, se dispone de las permutaciones siguientes:

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 trivalentes de serogrupos de *N. meningitidis*, se dispone de las permutaciones siguientes:

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

Haemophilus influenzae de tipo B

Cuando la composición incluye un antígeno de *H. influenzae* tipo B, normalmente incluirá un antígeno de sacárido capsular Hib, Los antígenos sacáridos de *H. influenzae* b son bien conocidos.

De forma ventajosa, el sacárido Hib está conjugado covalentemente a una proteína transportadora con el fin de potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos en general y del polisacárido capsular de Hib en particular está bien documentada [p. ej., referencias 142 a 150 etc.]. La invención puede usar cualquier conjugado Hib. Proteínas transportadoras adecuadas se describen más adelante y los transportadores preferidos para sacáridos Hib son CRM₁₉₇ ('HbOC'), toxoide del tétanos ('PRP-T') y el complejo de membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

El resto sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (p. ej., poliribosilribitol fosfato de longitud completa (PRP)), pero se prefiere hidrolizar polisacáridos para formar oligosacáridos (p. ej., PM de ~ 1 a ~ 5 kDa).

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ a través de un ligador de ácido adípico [151, 152]. El toxoide del tétanos también es un transportador preferido.

La administración del antígeno Hib tiene como resultado, preferentemente, una concentración de

anticuerpos anti-PRP de $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ y, más preferentemente, $\geq 1 \mu\text{g/ml}$.

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

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

10 Los antígenos Hib puede estar liofilizados, *por ejemplo* junto con antígenos meningocócicos.

Streptococcus pneumoniae

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

25 Como alternativa al uso de antígenos sacáridos de neumococos, la composición puede incluir uno o más antígenos polipeptídicos. Se dispone de secuencias genómicas para varias cepas de neumococos [160, 161] y se pueden someter a vacunología inversa [162-165] para identificar antígenos polipeptídicos adecuados [166, 167]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los antígenos siguientes: 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 (p. ej., 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13 o 14) de estos antígenos.

30 En algunas formas de realización, la composición puede incluir los antígenos sacárido y polipeptídico de neumococo. Estos se pueden usar en mezcla simple, o el antígeno sacárido neumocócico puede conjugarse con una proteína neumocócica. Proteínas transportadoras adecuadas para dichas formas de realización incluyen los antígenos indicados en el párrafo anterior [168].

35 Los antígenos neumocócicos puede estar liofilizados, *por ejemplo* junto con antígenos meningocócicos y/o Hib.

Conjugación covalente

40 Los sacáridos capsulares en las composiciones estarán habitualmente conjugados a proteína(s) transportadora(s). En general, la conjugación potencia la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte de antígenos independientes de linfocitos T en antígenos dependientes de linfocitos T, lo que permite la iniciación de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida [p. ej., revisada en las referencias 169 y 142-150].

45 Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como el toxoide de difteria o el toxoide del tétanos. El toxoide de difteria CRM₁₉₇ [170-172] es particularmente preferido. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [173], péptidos sintéticos [174,175], proteínas del shock térmico [176,177], proteínas de pertussis [178,179], citocinas [180], linfocinas [180], hormonas [180], factores de crecimiento [180], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de células T CD4+ humanas de varios antígenos derivados de patógenos [181], proteína D de *H. influenzae* [182, 183], proteína de superficie neumocócica PspA [184], proteínas de captación de hierro [185], toxina A o B de *C. difficile* [186], etc. Los transportadores preferidos son el toxoide de difteria, el toxoide del tétanos, la proteína D de *H. influenzae* y CRM₁₉₇.

55 Dentro de una composición es posible usar más de una proteína transportadora, *por ejemplo* para reducir el riesgo de supresión del transportador. Por tanto, se pueden usar diferentes proteínas transportadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A se podrían conjugar con CRM₁₉₇ mientras que los sacáridos del serogrupo C podrían conjugar con el toxoide del tétanos. También es posible usar más de una proteína transportadora para un antígeno sacárido concreto, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM₁₉₇ y otros conjugados con el toxoide del tétanos. No obstante, en general, se prefiere usar la misma proteína transportadora para todos los sacáridos.

65 Una proteína transportadora única podría transportar más de un antígeno sacárido [187]. Por ejemplo, Una proteína transportadora única podría tener conjugados sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este

objetivo, los sacáridos se pueden mezclar antes de la reacción de conjugación. No obstante, en general, se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo.

Se prefieren los conjugados con una proporción sacárido:proteína (p/p) de ente 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido). Se prefieren las proporciones de 1:2 y 5:1, como son más preferidas las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Para MenA y MenC se puede preferir un exceso de la proteína transportadora. Los conjugados se pueden usar junto con la proteína transportadora libre [188]. Cuando una proteína transportadora dada está presente en forma tanto libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es, preferentemente, no superior al 5% de la cantidad total de la proteína transportadora en la composición como un todo y, más preferentemente, presente a menos del 2% en peso.

Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligador adecuado cuando sea necesario.

Normalmente, el sacárido se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (p. ej., 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [189, 190 *etc.*]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 148).

Se pueden establecer enlaces a través de un grupo ligador usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 191 y 192. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo ligador de ácido adípico y, después, acoplamiento de una proteína en el 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 glicosídicos [198], ácido 6-aminocaproico [199], ADH [200], restos de C₄ a C₁₂ [201] *etc.* Como alternativa al uso de un ligador, se puede usar enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido, seguida de aminación reductora con la proteína, tal como se ha descrito en, por ejemplo, las referencias 202 y 203.

Un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (p. ej., mediante sustitución de los grupos =O terminales con -NH₂), seguido por derivación con un diéster adípico (p. ej., N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico) y se prefiere la reacción con la proteína transportadora. Otra reacción preferida usa activación con CDAP con una proteína D transportadora, por ejemplo MenA o MenC.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados se pueden separar. Hay muchos procedimientos adecuados, incluidos cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración *etc.* [véanse también las referencias 204 y 205, *etc.*].

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

Antígenos polipeptídicos del serogrupo B adicionales y alternativos

La invención proporciona una composición que, después de administrar a un sujeto, puede inducir una respuesta de anticuerpos en dicho sujeto, en la que la respuesta de anticuerpos es bactericida contra dos o tres linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 de *N. meningitidis* del serogrupo B.

Aunque NaDA, 741, 936, 953 y 287 son antígenos requeridos para alcanzar esta amplia protección, otros antígenos polipeptídicos de MenB que pueden incluirse de forma adicional en las composiciones (opcionalmente en combinación con uno o más de los cinco antígenos básicos) incluyen los que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEC ID N° 650 de la referencia 8; SEC ID N° 878 de la referencia 8; SEC ID N° 884 de la referencia 8; SEC ID N° 4 de la referencia 9; SEC ID N° 598 de la referencia 10; SEC ID N° 818 de la referencia 10; SEC ID N° 864 de la referencia 10; SEC ID N° 866 de la referencia 10; SEC ID N° 1196 de la referencia 10; SEC ID N° 1272 de la referencia 10; SEC ID N° 1274 de la referencia 10; SEC ID N° 1640 de la referencia 10; SEC ID N° 1788 de la referencia 10; SEC ID N° 2288 de la referencia 10; SEC ID N° 2466 de la referencia 10; SEC ID N° 2554 de la referencia 10; SEC ID N° 2576 de la referencia 10; SEC ID N° 2606 de la referencia 10; SEC ID N° 2608 de la referencia 10; SEC ID N° 2616 de la referencia 10; SEC ID N° 2668 de la referencia 10; SEC ID N° 2780 de la referencia 10; SEC ID N° 2932 de la referencia 10; SEC ID N° 2958 de la referencia 10; SEC ID N° 2970 de la referencia 10; SEC ID N° 2988 de la referencia 10, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene una identidad del 50% o más (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos *n* aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, en las que *n* es 7 o más (p. ej. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítipo de la secuencia relevante. Se pueden incluir más de uno (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos.

General

5 El término "que comprende" significa "que incluye" además de "que consiste en", *por ejemplo* una composición "que comprende" X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo* X + Y.

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

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, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

15 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando se alinean, que el porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 206. Una alineación preferida se determina mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en la referencia 207.

20 El término "alquilo" se refiere a grupos "alquilo" en formas tanto lineal como ramificada. El grupo alquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo también puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 enlaces dobles y/o triples. No obstante, el término "alquilo" normalmente se refiere a grupos alquilo que no tienen interrupciones con heteroátomo o interrupciones con dobles o triples enlaces. Cuando se hace referencia a alquilo C₁₋₁₂, se quiere decir que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (*p. ej.*, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). De forma similar, cuando se hace referencia a alquilo C₁₋₆, se quiere decir que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (*p. ej.*, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

30 El término "cicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, así como combinaciones de éstos con grupos alquilo, tales como grupos cicloalquilalquilo. El grupo cicloalquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- o -S-. No obstante, el término "cicloalquilo" normalmente se refiere a grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones con heteroátomos. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C₃₋₁₂, se quiere decir que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (*p. ej.*, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

35 El término "arilo" se refiere a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a arilo C₅₋₁₂, se quiere decir que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (*p. ej.*, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

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

45 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-fluorometoxicarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tales como β-trimetilsililetanosulfino (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C₁₋₁₂, bencilo, benchidriilo, tritilo, 9-fenilfluorenilo *etc.* Un grupo protector de nitrógeno preferido es Fmoc.

50 Las secuencias incluidas para facilita la clonación o purificación *etc.*, no necesariamente contribuyen a la invención y pueden omitirse o eliminarse.

55 Se apreciará que pueden existir anillos de azúcar en forma abierta y cerrada y que, mientras que las formas cerradas se muestran en las fórmulas estructurales de la presente memoria descriptiva, las formas abiertas también quedan abarcadas por la invención.

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION**Proteína híbrida ΔG287-953**

60 El ADN que codifica la proteína 287 de la cepa meningocócica 394/98 del serogrupo B y la proteína 953 de la cepa meningocócica 2996 del serogrupo B se digirió y ligó junto con una corta secuencia ligadora, para dar un plásmido codificador de la secuencia de aminoácidos SEC ID 7. El plásmido se transfeccionó en *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína.

65

Después del crecimiento adecuado se recogieron las bacterias y se purificó la proteína. Del cultivo, las bacterias se centrifugaron y el sedimento se homogeneizó en presencia de tampón acetato 50 mM (Ph 5) con una proporción en volumen del sedimento:tampón de 1: 8. La lisis se realizó usando un homogeneizador de alta presión (AVESTIN, 4 ciclos a 14000 psi). Tras la lisis se añadió urea a una concentración final de 5M, seguida por agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. El pH se redujo de 6 a 5 usando tampón acetato 200 mM (pH 4) + urea 5M. La mezcla se centrifugó a 16800 g durante 60 minutos a 2-8°C. El sobrenadante se recogió y se filtró mediante SARTOBRAN P (0,45 – 0,22 µm SARTORIUS).

La proteína en el sobrenadante fue estable durante ≥ 30 días a -20°C y durante ≥ 15 días a 2-8°C.

La proteína se purificó adicionalmente en una columna de intercambio catiónico (SPFF, Amersham Biosciences) con elución usando NaCl 350 mM + acetato 50 mM + urea 5M a pH 5,00. La mayoría de las impurezas estaba presente en el flujo continuo. Un lavado de pre-elución usando una concentración de NaCl menor (180 mM) eliminó de forma ventajosa dos proteínas de *E. coli* contaminantes.

El material eluido se ajustó a un pH 8 (usando TRIS/HCl 200 mM + urea 5 M pH 9) y se purificó adicionalmente en una columna de Q Sepharosa HP (Amersham) con elución usando NaCl 150 mM + TRIS/HCl 20 mM a pH 8,00 en urea 5 M. De nuevo, un lavado de pre-elución con niveles reducidos de sales (90 mM) fue útil para eliminar las impurezas.

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

Proteína híbrida 936-ΔG741

El ADN que codifica la proteína 936 de la cepa meningocócica 2966 del serogrupo B y la proteína 741 de la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B se digirió y ligó junto con una corta secuencia ligadora, para dar un plásmido codificador de la secuencia de aminoácidos SEC ID 8. El plásmido se transfeccionó en *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína. La proteína recombinante no se secretó, sino que permaneció soluble dentro de la bacteria.

Después de un crecimiento adecuado, las bacterias se centrifugaron para dar una pasta húmeda y se trataron del siguiente modo:

- Homogeneización mediante sistema de alta presión en presencia de fosfato sódico 20 mM, pH 7,00.
- Centrifugación y clarificación mediante filtración ortogonal.
- Cromatografía en columna catiónica (SP Sepharose Fast Flow), con elución mediante NaCl 150 mM en fosfato sódico 20 mM, pH 7,00.
- Cromatografía en columna aniónica (Q Sepharose XL) con recolección continua.
- Cromatografía en columna hidrofóbica (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) con elución por fosfato sódico 20 mM a pH 7,00.
- Diafiltración contra PBS a 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 al menos 3 meses tanto a -20°C como a 2-8°C.

Proteína NadA^{(NL)(C)}

El ADN que codifica la proteína NadA de la cepa meningocócica 2966 del serogrupo B y se digirió para eliminar la secuencia que codifica su extremo C, para dar un plásmido codificador de la secuencia de aminoácidos SEC ID 1. El plásmido se transfeccionó en *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína. La proteína recombinante se secretó en el medio de cultivo y el péptido líder estaba ausente en la proteína secretada (SEC ID 2). El sobrenadante se trató del siguiente modo:

- Concentración 7X y diafiltración contra el tampón TRIS/HCl 20 mM a pH 7,6 mediante UF de flujo transversal (corte de 30 Kd).
- Cromatografía en columna catiónica (Q Sepharose XL), con elución mediante NaCl 400 mM en TRIS/HCl 20 mM, pH 7,6.
- Etapa de cromatografía en columna hidrofóbica (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) con elución NaCl 50 mM en TRIS/HCl a pH 7,6.
- Cromatografía en columna cerámica con hidroxilapatita (HA Macro.Prep) con elución mediante

- fosfato sódico 200 mM pH 7,4.
- Dialfiltración (corte 30 Kd) contra PBS a pH 7,4.
- Filtración estéril final y almacenamiento a -20°C.

5 La proteína en el material final fue estable durante al menos 6 meses tanto a -20°C como a 2-8°C.

10 La proteína NadA es susceptible a la degradación y las formas truncadas de NadA pueden detectarse mediante transferencia de tipo western o mediante espectrometría de masas (p. ej., mediante MALDI-TOF) que indica una pérdida de PM de hasta 10 kDa. Los productos de degradación se pueden separar de la NadA nativa mediante filtración en gel (p. ej., usando la columna TSK 300SWXL, precolumna TSKSWXL, TOSOHAAS). Dicha filtración da tres picos: (i) un primer pico con tiempo de retención 12,637 min y PM aparente 885,036 Da; (ii) tiempo de retención 13,871 min y PM aparente 530,388 Da; (iii) tiempo de retención 13,871 min y un PC 530,388 Da. El análisis de dispersión de luz de los tres picos revela valores reales de PM de (i) 208500 Da, (ii) 98460 Da, (iii) 78760 Da. Por tanto, el primer pico contiene agregados de NadA y el tercer pico contiene productos de degradación.

15 Dado que el peso molecular predicho de NadA^{(NL)(C)} es 34,113 Da, el pico (ii) contiene una proteína trimérica, que es el antígeno deseado.

Combinaciones antigénicas

20 Ratones fueron inmunizados con una composición que comprende las tres proteínas y un adyuvante de hidróxido de aluminio. Para los fines comparativos, las tres proteínas también se sometieron a ensayo una por una. Se usaron diez ratones por grupo. La mezcla indujo altos títulos bactericidas contra varias cepas:

25

	Cepa meningocócica ^(Serogrupo)							
	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44176 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C ₁₁ ^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
30 (2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000
Mezcla	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000

35

-¹ indica que esta cepa no contiene gen de NadA en ratones individuales, la triple mezcla indujo títulos bactericidas elevados y consistentes contra las tres cepas del serogrupo B a partir de las cuales derivan los antígenos individuales:

40

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
45 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 OMV

50 En otros experimentos, los antígenos adyuvados (20 µg de cada antígeno por dosis) se administraron en combinación con 10 µg de OMV preparados a partir de la cepa H44/76 (Noruega) o la cepa 394/99 (Nueva Zelanda). Los controles positivos fueron el AcMo anticapsular SEAM-3 para el serogrupo B o los sacáridos capsulares conjugados-CRM197 para otras cepas. Los resultados (títulos bactericidas) se muestran en la Tabla 1. La mezcla casi siempre da mejores títulos que las simples OMV y, además, la adición de la mezcla con OMV casi siempre potencia de forma significativa la eficacia de las OMV. Además, en muchos casos, la mezcla de antígenos coincide o supera la respuesta observada con el control positivo.

55

Ensayos de linajes hipervirulentos

60 Los antígenos siguientes se sometieron a ensayo contra diversas cepas del serogrupo B a partir de diversos linajes hipervirulentos:

- 65
- (a) NadA^{(NL)(C)}
 - (b) ΔG287 - 953

- (c) 936 - ΔG741
- (d) una mezcla de (a), (b) y (c)
- (e) OMV preparadas a partir de la cepa H44/76 (Noruega)
- (f) OMV preparadas a partir de la cepa 394/98 (Nueva Zelanda)
- (g) Una mezcla de ΔG287 y (e)
- (g) Una mezcla de (d) y (e)
- (i) Una mezcla de (d) y (f)

Como control positivo se usó SEAM-3.

Los resultados fueron los siguientes, expresados en forma del porcentaje de cepas en el linaje hipervirulento indicado en el que el título bactericida en suero superó 1024:

	Nº de 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 concretas, los títulos bactericidas fueron los siguientes:

	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

Por tanto, las composiciones (d), (h) e (i) inducen respuestas de anticuerpos bactericidas contra una amplia variedad de cepas de meningococos del serogrupo B a partir de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3. Los títulos usando las composiciones (h) e (i) fueron, en general, mayores que con (d), pero la cobertura de las cepas en los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 no fue mejor.

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

Análisis del dominio en N terminal de NadA

Se sabe que la proteína purificada NadA de *N. meningitidis* se une a células epiteliales humanas [17] (p. ej., células Chang, células HeLa, células Hep-2) y la *E.coli* recombinante que expresa NadA muestran un fenotipo adherente [18] Estas *E.coli* también pueden invadir células epiteliales y NadA^{+ve} en *E. coli* se puede detectar en células de Chang mediante inmunofluorescencia (tras la permeabilización de la membrana) y mediante microscopía electrónica. Por tanto, se cree que la NadA funciona como una adhesina y una invagina para las células epiteliales.

Sobre la base del análisis de la estructura secundaria, la NadA madura se ha subdividido en tres dominios putativos: Un dominio globular en N-terminal (aa 24-87), una región interna en α-hélice (aa 88-350) con una propensión enrollado-enrollamiento alta y un anclaje de membrana en el extremo C (aa 351-405). Se investigó el papel del dominio globular en el extremo N en la interacción huésped-célula.

Un gen nadA truncado codificador de una proteína desprovista de los aminoácidos 30-87 se clonó en el vector pET-21 (pET-NadAΔ30-87) y se expresó en la cepa BL21 de *E. coli* (DE3). Los aminoácidos 24-29 se conservaron para permitir el procesamiento del péptido líder y la correcta maduración de la proteína. La transferencia de tipo western y el análisis FACS confirmaron que NadAΔ30-87 se había expresado y formado oligómeros sobre la superficie celular de *E. coli*, es decir la delección del dominio en el extremo N no interfiere con la expresión, exportación y localización en la membrana de NadA. No obstante, la cepa de *E.coli* recombinante perdió completamente la capacidad para adherirse a las células epiteliales de Chang. Por tanto, el dominio en el extremo N está implicado en la actividad de la adhesina.

Para investigar más qué parte del dominio del extremo N está implicada en la interacción, la región se

dividió adicionalmente en tres subdominios putativos. aminoácidos 24-42, que contienen una región prevista en α -hélice con residuos hidrófobos; aminoácidos 43-70, la parte interna sin una estructura secundaria definida predicha; y los aminoácidos 71-87 que contienen otra estructura predicha en α -hélice. Se generaron tres construíos, codificando cada uno una proteína delecionada de un subdominio único, y, después, se introdujeron en *E. coli* BL21 (DE3), obteniendo las cepas siguientes: BL21 (DE3)/pET-NadA Δ 24-42, BL21 (DE3)/pET-NadA Δ 43-70 y BL21 (DE3)/pET-NadA Δ 171-87. La localización en la superficie de los oligómeros se confirmó mediante transferencia de tipo western y análisis FACS, pero la adhesión a las células epiteliales de Chang no fue mejor que la cepa de *E. coli* BL21 (DE3)/pET. Estos resultados, confirmados también usando análisis de microscopia de inmunofluorescencia, indican que todo el dominio globular en el extremo N de NadA es importante en la interacción con células humanas.

Combinación con conjugados meningocócicos y/o Hib

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

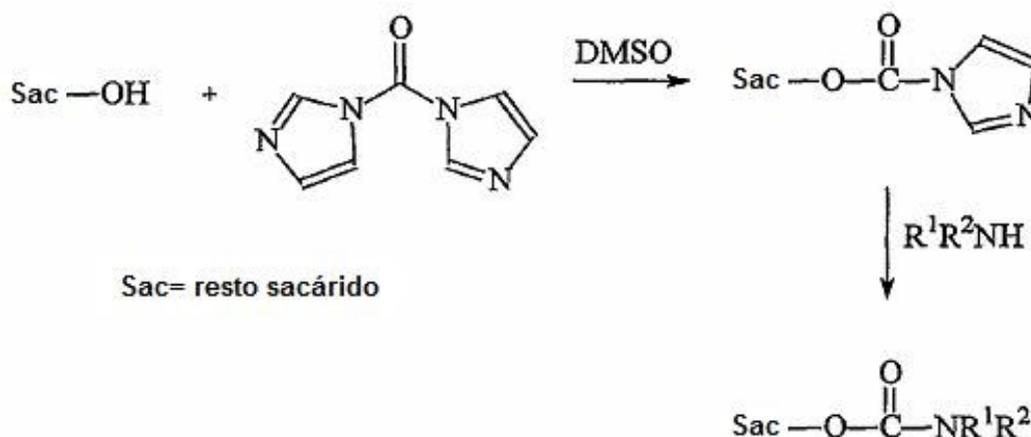
Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo C	10 μ g de sacárido + 12,5-25 μ g de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135C	10 μ g de sacárido + 6,6-20 μ g de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	10 μ g de sacárido + 6,6-20 μ g de CRM ₁₉₇
Δ G287-953	20 μ g de polipéptido
936- Δ G741	20 μ g de polipéptido
NadA	20 μ g de polipéptido

Se prepara una vacuna similar, incluido el conjugado de MENA (10 μ g de sacárido + 12,5-33 μ g de CRM₁₉₇) y/o un conjugado de HbOC Hib (10 μ g de sacárido + 2-5 μ g de CRM₁₉₇).

Uso de sacárido MenA modificado

El lipopolisacárido capsular se purificó a partir de MenA y se hidrolizó para dar el oligosacárido MenA. El polisacárido (2 g) se hidrolizó a 50°C en tampón de acetato sódico 50 mM, pH 4,75 a una concentración del polisacárido de 10 mg/ml durante aproximadamente 4 horas [135]. Tras la hidrólisis, la solución se secó mediante evaporación rotatoria.

El oligosacárido se activó usando el siguiente esquema de reacción:



El oligosacárido se disolvió en DMSO para dar una concentración del sacárido de 10 mg/ml. De acuerdo con una proporción molar de oligosacárido:CDI de 1:20, se añadieron 21,262 g de CDI y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El compuesto MenA-CDI resultante se purificó mediante precipitación selectiva en una mezcla de 80:20 (v/v) de acetona:DMSO seguida por centrifugación. La eficiencia de la reacción de activación se calculó que era de aproximadamente 67,9% determinando la proporción entre el

imidazol libre y el imidazol unido.

En la segunda etapa de reacción, el oligosacárido MENA-CDI se solubilizó en DMSO a una concentración de sacárido de aproximadamente 10 mg/ml. De acuerdo con una proporción molar de unidad de MENA-CDI:DMA 1:100, se añadieron 36,288 g de 99% de dimetilamina clorhidrato (es decir, R¹ y R² = Me) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se liofilizó y se re-solubilizó en 10 mg/ml de solución en agua.

Para eliminar el reactivo 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 (SpectraiPor™). Se llevaron a cabo cuatro etapas de diálisis: (i) 16 horas contra 2 l de cloruro sódico 1M (factor de diálisis 1:20), (ii) 16 horas contra 2 l de cloruro sódico 0,5M (factor de diálisis 1:20), (iii) y (iv) 16 horas contra 2 l de WFI (factor de diálisis 1:20). Para Mejorar la purificación también se realizó una etapa de diafiltración a través de una membrana MWCO 1kDa (Centricon™).

El producto MenA-CDI-DMA purificado se tamponó a pH 6,5 en L-histidina 25 mM (Fluka™).

Para preparar los conjugados del sacárido MenA modificado (MenA-CDI-DMA), el procedimiento global fue el siguiente:

- Hidrólisis del polisacárido para dar fragmentos oligosacáridos
- Cálculo del tamaño de los fragmentos de oligosacárido
- Aminación reductora de los grupos aldehídos terminales en los oligosacáridos medidos
- Protección de los grupos -NH₂ terminales por 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 mediante SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimida adípico)
- unión covalente a la proteína CRM₁₉₇

El conjugado oligosacárido MenA modificado es mucho más resistente a la hidrólisis que su homólogo natural a temperaturas elevadas. Después de 28 días a 37°C, por ejemplo, el porcentaje de sacárido liberado es 6,4% para el oligosacárido modificado frente al 23,5% para el antígeno natural. Además, los títulos inducidos por los oligosacáridos modificados no son significativamente menores que los obtenidos usando las estructuras de azúcar nativas.

El conjugado de MENA modificado se combina con los conjugados de MenC, MenW125 y MenY como sustituto para el conjugado del oligosacárido sin modificar. Esta mezcla tetravalente se mezcla con los tres polipéptidos de MenB para dar una vacuna eficaz contra los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis* en una dosis única.

Combinaciones neumocócicas

Las tres proteínas de MENB combinadas se mezclan con conjugados sacáridos de neumocócicos para dar una concentración final de 2 µg/dosis de cada uno de los serotipos neumocócicos (doble para el serotipo 6B). Por tanto, la vacuna reconstituida contiene los siguientes antígenos:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	5 µg de sacárido +6,25-16,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	5 µg de sacárido +6,25-12,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135C	5 µg de sacárido +3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	5 µg de sacárido +3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 4	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 9V	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 14	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 18C	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 19F	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 23F	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 68	4 µg de sacárido +5 µg de CRM ₁₉₇

REFERENCIAS (cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia)

- 5 [1] Maiden y col. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
 [2] Armand y col. (1982) J. Biol. Stand. 10:335-339.
 [3] Cadoz y col. (1985) Vaccine 3:340-342.
 [4] Bjune y col. (1991) Lancet 338(8775): 1093-96
 [5] Parkhill y col. (2000) Nature 404:502-506.
 10 [6] Tettelin y col. (2000) Science 287: 1809-1815.
 [7] WOOO/66791.
 [8] W099/24578.
 [9] W099/36544.
 [10] W099/57280.
 [11] WOOO/22430.
 15 [12] WOOO/66741 .
 [13] Pizza y col. (2000) Science 287: 1816-1820.
 [14] W001/64920.
 [15] W001/64922.
 [16] W003/020756.
 20 [17] Comanducci y col. (2002) J. Exp. Med. 195: 1445-1454.
 [18] W003/01 0194.
 [19] UK patent application 0227346.4.
 [20] W003/063766.
 [21] Masignani y col. (2003) J Exp Med 197:789-799.
 25 [22] <http://neisseria.org/nm/typing/mist/>
 [23] Pettersson y col. (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
 [24] Welsch y col. (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 Band C Neisseria meningitidis strains.
 30 [25] Santos y col. (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] W003/009869.
 [27] W001/30390.
 35 [28] Almeida & Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.
 [29] Agarwal & Mishra (1999) Indian J Exp Bioi 37:6-16.
 [30] WOOO/53221.
 [31] Jakobsen y col. (2002) Infect Immun 70:1443-1452.
 [32] Wu y col. (1997) J Infect Dis 175:839-846.
 40 [33] Bergquist y col. (1998) APM IS 106:800-806.
 [34] Baudner y col. (2002) Infect Immun 70:4785-4790.
 [35] Ugozzoli y col. (2002) J Infect Dis 186:1358-1361.
 [36] Paoletti y col. (2001) Vaccine 19:2118-2126.
 [37] WOOO/56365.
 45 [38] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
 [39] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 [40] WOOO/231 05.
 [41] W090/14837.
 [42] Patente de EE.UU. 5,057,540.
 50 [43] W096/33739.
 [44] EP-A-0109942.
 [45] W096/11711.
 [46] WOOO/07621.
 [47] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
 55 [48] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
 [49] Niikura y col. (2002) Virology 293:273-280.
 [50] Lenz y col. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
 [51] Pinto etal. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
 [52] Gerber y col. (2001) Virol 75:4752-4760.
 60 [53] W003/024480
 [54] W003/024481
 [55] Gluck y col. (2002) Vaccine 20:B1 0-B16.
 [56] EP-A-0689454.
 [57] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
 65 [58] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.

- [59] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21 :2485-2491.
- [60] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21 :836-842.
- [61] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31 :2393-2400.
- [62] W002/26757.
- 5 [63] W099/62923.
- [64] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [65] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179-185.
- [66] W098/401 00.
- [67] Patente de EE.UU. 6,207,646.
- 10 [68] Patente de EE.UU. 6,239,116.
- [69] Patente de EE.UU. 6,429,199.
- [70] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [71] Blackwell y col. (2003) *J Immunol*170:4061-4068.
- [72] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- 15 [73] W001/95935.
- [74] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [75] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [76] W003/035836.
- [77] W095/17211.
- 20 [78] W098/42375.
- [79] Beignon y col. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [80] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [81] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [82] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- 25 [83] Ryan y col. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [84] Partidos y col. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [85] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [86] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [87] Domenighini y col. (1995) *Mol Microbiol*15:1165-1167.
- 30 [88] W099/40936.
- [89] W099/44636.
- [90] Singh et al] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [91] W099/27960.
- [92] Patente de EE.UU. 6,090,406
- 35 [93] Patente de EE.UU. 5,916,588
- [94] EP-A-0626169.
- [95] W099/52549.
- [96] W001/21207.
- [97] W001/21152.
- 40 [98] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [99] Payne y col. (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.
- [1 02] W099/11241 .
- 45 [103] W094/00153.
- [104] W098/57659.
- [105] Solicitudes de patentes europeas 0835318, 0735898 y 0761231.
- [106] W096/37222; Patente de EE.UU. 6,333,036..
- [107] Costantino y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- 50 [108] W003/007985.
- [109] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.
- [110] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [111] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [112] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- 55 [113] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- [114] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [115] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [116] W001/52885.
- [117] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- 60 [118] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [119] Sutter y col. (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 y col. (1997) *Annu Rev Immunol*15:617-648.
- 65 [123] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.

- [124] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- [125] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- [126] Dubensky y col. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- [127] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55: 1-74.
- 5 [128] Donnelly y col. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- [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 y col. (2000) *Vaccine* 18:1253-1263.
- 10 [133] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [134] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [135] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [136] W003/080678.
- [137] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
- 15 [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.
- [140] Kandil y col. (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
- [141] Berkin y col. (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
- [142] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- 20 [143] Buttery & Moxon (2000) *JR Coli Physicians Lond* 34:163-168.
- [144] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [145] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [146] Patente europea 0477508.
- [147] Patente de EE.UU. 5,306,492.
- 25 [148] W098/42721.
- [149] Dick y col. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [150] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [151] Kanra y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.
- [152] Ravenscroft y col. (2000) *Dev Bioi* (Basel) 103: 35-47.
- 30 [153] W097/00697.
- [154] W002/00249.
- [155] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [156] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [157] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Bioi Rev* 65:187-207.
- 35 [158] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- [159] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- [160] Tettelin y col. (2001) *Science* 293:498-506.
- [161] Hoskins y col. (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.
- [162] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
- 40 [163] Rappuoli (2001) *Vacuna* 19:2688-2691
- [164] Massignani y col. (2002) *Expert Opin Bioi Ther* 2:895-905.
- [165] Mora y col. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- [166] Wizemann y col. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [167] Rigden y col. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Bioi* 38:143-168.
- 45 [168] W002/22167.
- [169] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [170] Anónimo (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [171] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [172] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- 50 [173] EP-A-0372501.
- [174] EP-A-0378881.
- [175] EP-A-0427347.
- [176] W093/17712
- [177] W094/03208.
- 55 [178] W098/58668.
- [179] EP-A-0471177.
- [180] W091/01146
- Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- 60 EP-A-0594610.
- WO00/56360.
- WO02/091998.
- WO01/72337
- WO00/61761.
- WO99/42130
- 65 WO96/40242

5 Lees et al. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
WO95/08348.
Patente de Estados Unidos 4,882,317
Patente de Estados Unidos 4,695,624
Porro et al. (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s
EP-A-0208375
WO00/10599
10 Gever et al. *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
Patente de Estados Unidos 4,057,685.
Patentes de Estados Unidos 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
Patente de Estados Unidos 4,459,286.
Patente de Estados Unidos 4,965,338
Patente de Estados Unidos 4,663,160.
15 Patente de Estados Unidos 4,761,283
Patente de Estados Unidos 4,356,170
Lei et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
WO00/38711; Patente de Estados Unidos 6,146,902.
Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30.
20 Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 1

	2996	NGH38	M4215	MC58	44/76	CU385	N44/89	394/98	M01- 240149	NM092	NM008	8Z198	961- 5945	G2136	5/99	F6124	8Z133	LPN 17592	240539
Tipado	B:2b;P1,5a,2a	B:NT;P1,3	B:15;P7,16	B:15;P7,16b	B:15;P1,16	B:4;P1,15	B:4,7;P1,19,15	B:4;P1,4	B:4;P7,4	B:4;P1,4	B:4;P1,4	B:NT	B:2b;P12,1,16B	B:2b;P1,5,2	A	ctIT:	W135	PI,5	
ET:	otros	otros	n.d.	ET5	ET5	ET5	ET5	lin.3	lin.3	lin3	lin3	lin3	A4	A4	A4	sill	sl		
Control positivo	32768	32768	32768	16384	>16384	>16384	8192	16384	8192	32768	8192	16384	8192	32768	8192	1024	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	16384	8192	>65536	32768	524288	>65536	>4096	16384	8192	>4096	>4096	>4096	>8192	2048	>4096	32768	32768	16384	>8192
OMV's																			
Antígenos+																			
394/98	8192	8192	>65536	32768	>65536	>65536	>4096	65536	>8192	>4096	>4096	>4096	2048	8192	>4096	65536	65536	65536	>8192
OMV																			
OMV (Noruega)	<4	1024	8192	2048	262144	256	<8	4096	<4	<8	<8	<4	>8192	<8	<8	1024	<4	<8	>4096
OMV (NZ)	512	<4	128	2048	<4	<8	<8	32768	>8192	4096	1024	4096	<16	n.d.	<8	4096	1024	<8	>4096

LISTADO DE SECUENCIAS

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

5 <120> VACUNAS QUE INCLUYEN NadA MENINGOCÓCICO OLIGOMÉRICO PARA PROTECCIÓN AMPLIA
CONTRA LINAJES HIPERVIRULENTOS

<130> P055399EP

10 <140> EP-10_._
<141> 2003-10-02

<150> EP-03758486.9
<151> 2003-10-02

15 <150> PCT/IB03/04848
<151> 2003-10-02

20 <150> GB-0309115.4
<151> 2003-04-22

<150> GB-0305831.0
<151> 2003-03-13

25 <150> GB-0223741.0
<151> 2002-10-11

<160> 12

30 <170> SeqWin2010, versión 1.0

<210> 1
<211> 350
<212> PRT

35 <213> Neisseria meningitidis

<400> 1

40 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

45 Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile
35 40 45

50 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

55 Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr
85 90 95

60 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

65 Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn

ES 2 775 098 T3

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

<210> 2
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

50 <400> 2

55

60

65

ES 2 775 098 T3

Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala
1 5 10 15

5 Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu
20 25 30

10 Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala
35 40 45

15 Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys
50 55 60

20 Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn
65 70 75 80

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 775 098 T3

Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr
 85 90 95
 5 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
 10 Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys
 130 135 140
 15 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
 20 Val Lys Thr Ala Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln
 180 185 190
 25 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
 30 Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys
 225 230 235 240
 35 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
 40 Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp
 275 280 285
 45 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
 50 Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly
 325

55 <210> 3
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

60 <400> 3

65

ES 2 775 098 T3

1 Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 5 Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
 10 Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 15 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 20 Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
 25 Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His
 30 Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His
 35 Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala
 40 Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr
 45 Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr
 50 Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His
 55 Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys
 60 Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn
 65 Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala
 70 Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg
 75 His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 80 245

<210> 4

<211> 179

55 <212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 4

60

65

ES 2 775 098 T3

1 Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala Val
 5 Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala Leu
 10 Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr
 15 Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asn Arg His Leu
 20 Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly
 25 Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile
 30 Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr
 35 Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala
 40 Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val
 45 Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val
 50 Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr
 55 Val Gln Arg
 <210> 5
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 5

ES 2 775 098 T3

Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile
 1 5 10 15

5 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

10 Thr Ile Pro Ile Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp
 50 55 60

15 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

20 Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu
 100 105 110

25 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

30 Met Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp
 145 150 155 160

35 Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
 165

<210> 6
 <211> 464
 <212> PRT
 40 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 6

45
 50
 55
 60
 65

ES 2 775 098 T3

	Ser	Pro	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Ala	Ala	Pro
	1				5					10					15	
5	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
10			35					40					45			
	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Val	Thr	Ala
		50					55					60				
15	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
20					85					90					95	
	Asn	Met	Leu	Ala	Gly	Asn	Met	Glu	Asn	Gln	Ala	Thr	Asp	Ala	Gly	Glu
				100					105					110		
25	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				
30	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Asn	Gln	Ala	Gly	Asn	Asn	Gln	Ala	Ala	Gly	Ser
						150					155					160
35	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		
40	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Cys	Ser	Gly
			195					200					205			
45	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
					230						235					240
50	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
55				260					265					270		
	Phe	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Met	Pro
			275					280					285			
60	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
65						310					315					320

ES 2 775 098 T3

Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr
 325 330 335
 5 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
 10 Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly
 370 375 380
 15 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
 20 Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly
 420 425 430
 25 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
 30
 <210> 7
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 35
 <400> 7
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 775 098 T3

1 Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 5 Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro
 10 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln
 15 Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
 20 Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
 25 Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
 30 Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala
 35 Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala
 40 Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly
 45 Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala
 50
 55
 60
 65

ES 2 775 098 T3

	145					150						155				160
	Gly	Ser	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Asn	Pro	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser
5					165					170					175	
	Gly	Gly	Asp	Phe	Gly	Arg	Thr	Asn	Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Ile	Asp
				180					185					190		
10	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				
15	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
20					245					250					255	
	Val	Gln	Met	Lys	Gly	Ile	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Phe	Tyr	Lys	Pro	Lys
				260					265					270		
25	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
30		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
35					325					330					335	
	Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Leu	Arg	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	Ser	Lys
40				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
45		370					375					380				
	Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser
	385					390					395					400
50	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
55				420					425					430		
	Ser	Gly	Lys	Phe	Tyr	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr
			435					440					445			
60	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
65	465					470					475					480

ES 2 775 098 T3

Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495
 5 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
 10 Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540
 15 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
 20 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
 25 Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620
 30 Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640
 35 Ala Ala Lys Gln

<210> 8

<211> 434

<212> PRT

40 <213> Neisseria meningitidis

<400> 8

45

50

55

60

65

ES 2 775 098 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
 5 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
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 775 098 T3

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

5 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

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

15 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

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

25 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

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

35 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

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

45 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

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

55 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

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

Lys Gln

65

ES 2 775 098 T3

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Conector
10
<400> 9
Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5
15 <210> 10
<211> 255
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis
20 <400> 10
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 775 098 T3

1 Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
 5 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
 10 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
 15 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
 20 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
 25 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
 30 Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu
 35 Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
 40 Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
 45 Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
 50 Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
 55 Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp
 60 Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile
 65 Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
 70 Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
 75 Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 80 245 250 255

<210> 11
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 11

ES 2 775 098 T3

1 Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
 5 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
 10 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
 15 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
 20 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
 25 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
 30 Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu
 35 Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser
 40 Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
 45 Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp
 50 Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
 55 His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 60 Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 65 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
 70 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 75 Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 80 245 250

<210> 12
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 12

ES 2 775 098 T3

1 Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
 5 Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys
 10 Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn
 15 Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala
 20 Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr
 25 Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Thr
 30 Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly
 35 Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser
 40 Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys
 45 Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp
 50 Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu
 55 Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu
 60 Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile
 65 Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 260

REIVINDICACIONES

- 5
1. NadA de *N.meningitidis* recombinante en forma trimérica, en donde la NadA consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 10
2. Una composición que comprende cinco antígenos meningocócicos: (1) una proteína NadA en forma trimérica, en donde la NadA consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; (2) una proteína 741 en donde la proteína 741 tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID 3; (3) una proteína 936 en donde la proteína 936 tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID 4; (4) una proteína 953 en donde la proteína 953 tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID 5; y (5) una proteína 287 en donde la proteína 287 tiene $\geq 85\%$ de identidad con la SEQ ID 6, en donde la composición no comprende antígenos de proteína meningocócica distintos de los antígenos (1) a (5).
- 15
3. La composición de la reivindicación 2, en donde la composición comprende un polipéptido de fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en donde: X es una secuencia de aminoácidos de uno de los cinco antígenos (1) a (5); L es una secuencia de aminoácidos conectora 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.
- 20
4. La composición de la reivindicación 3, en donde: (a) n es 2, X_1 es una proteína 936 y X_2 es una proteína 741; y/o (b) n es 2, X_1 es una proteína 287 y X_2 es una proteína 953.
- 25
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende (a) una proteína que comprende la SEQ ID 7 y/o (b) una proteína que comprende la SEQ ID 8.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende además un adyuvante de hidróxido de aluminio y, opcionalmente, un tampón de histidina.