



No. 10-052816- -00007-0000

Fecha: 2013-02-21 15:45:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 76

P-2542

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. 10.052.816
Solicitud de patente a nombre de **NOVARTIS AG**

Yo, DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **NOVARTIS AG** domiciliada en Basilea Suiza, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 18328 notificado por fijación en lista el 16 de octubre de 2012, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio el cual consta de 7 reivindicaciones dirigidas al kit.

Adicionalmente, se modifica el título de la invención, el cual queda del siguiente tenor: "Formulación dual para vacunas que comprende una emulsión de adyuvante de aceite en agua libre de sales de aluminio y un componente inmunogénico de meningitis B en forma liofilizada"

En cuanto a estas modificaciones, nos permitimos manifestar que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad planteadas por el examinador en su concepto técnico.

Teniendo en cuenta la solicitud el señor examinador, se presenta de nuevo la memoria descriptiva en donde se han aclarado términos como MENGUGATE®, MENINGITEC® y otros. Se colocó su significado como pie de páginas.

Se adjunta copia legible de la figura 3.

P-2542

000.01

No se presenta tasa por reivindicaciones adicionales dado que el nuevo pliego reivindicatorio contiene solo 7 reivindicaciones.

2. Claridad de la invención

En relación con las objeciones planteadas por el señor examinador, atentamente nos permitimos decir que con las modificaciones realizadas en la memoria descriptiva y con el nuevo pliego reivindicatorio quedan cabal mente superadas las objeciones.

3. Unidad de Invención

A la luz del nuevo capítulo reivindicatorio dirigido exclusivamente al kit, quedan cabalmente superadas estas objeciones.

4. Nivel inventivo

El enfoque de dos viales como se discute en el documento D1, se utiliza cuando la formulación de la vacuna del sacárido del serogrupo A es almacenada como un liofilizado.

En este sentido, es importante señalar que la descripción de D1 establece que "el sacárido del serogrupo A no se combina con otro u otros sacáridos hasta poco antes de su uso, con el fin de minimizar el potencial de hvdrolisis", lo cual no corresponde al problema resuelto por la presente solicitud.

De hecho, el problema es que los inmunógenos del serogrupo B muestra diferentes estabilidades dependiendo del adyuvante utilizado. En este sentido el adyuvante de aceite en agua contribuye a la estabilidad de la formulación de la vacuna MenB, un problema previamente desconocido (véase por favor la nueva página 2 segundo párrafo de la memoria descriptiva presentada con este escrito).

En ese orden de ideas, se buscaba una mejora en el sentido de evitar la necesidad de adsorber antígenos a hidróxido de aluminio con la concomitante pérdida de eficacia, los inventores probaron que los adyuvantes de aceite en agua realizan tal mejora. No obstante, esta formulación inesperadamente causó una disminución en la estabilidad y luego dicho problema fue resuelto mediante la liofilización del inmunógeno menB, lo cual probó ser un enfoque bastante útil para muchos antígenos y sacáridos de meningitis (véase por favor el tercer párrafo de la nueva página 3 de la memoria descriptiva).

En relación con el argumento que señala el señor examinador en el folio 148 donde indica que "El documento D2 describe una manera de solucionar el problema técnico, mediante la utilización de un adyuvante en emulsión aceite en agua..." y que "...es conocido

por la persona normalmente versada en la materia que la liofilización es una buena alternativa para el almacenamiento de una composición de vesículas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* grupo B en estado líquido y permite un ventajoso tiempo de almacenamiento de más de 1 año"; nos permitimos decir que no nos encontramos de acuerdo, dado que como se discute en la memoria descriptiva, principalmente en las tres primeras páginas, una característica común de las actuales vacunas de MenB es que ellas incluyen un adyuvante de hidróxido de aluminio. El rol de este adyuvante es el de incrementar la inmunogenicidad de la vacuna. No obstante, los inventores probaron una formulación de MenB sin este adyuvante y descubrieron que el hidróxido de aluminio también contribuye en la estabilidad de la vacuna. Por lo tanto, cuando se reemplazó el hidróxido de aluminio con una emulsión de aceite en agua se redujo la inmunogenicidad pero la vacuna resultante redujo su estabilidad. En este sentido, a fin de restablecer la estabilidad, los inventores encontraron que la mezcla de antígeno/emulsión debía de ser preparada y distribuida como componentes separados, listos para el mezclado extemporáneo y la administración justo al momento de su uso.

En este sentido, el solicitante es de la opinión de que no sería evidente a partir del arte previo citado por el examinador que el adyuvante de hidróxido de aluminio contribuyera a la estabilidad de las vacunas de MenB y mucho menos que el uso de un adyuvante alternativo (una emulsión de aceite en agua) daría una vacuna con estabilidad disminuida pero con una inmunogenicidad mantenida.

Las razones técnicas del solicitante para emplear "dos viales" es la estabilidad de los antígenos MenB en presencia de un adyuvante de emulsión de aceite en agua. Este problema de inestabilidad no había sido reportado en la técnica anterior, y entonces el uso de dos viales tampoco habría sido evidente a partir de D1, de hecho, esta anterioridad no proporciona guía útil dado que no trata con el asunto de la estabilidad del antígeno.

Ahora bien, si D2 usa antígenos conjugados liofilizados de Hib y MenC, dicha anterioridad no explica el porqué de la liofilización. De hecho, D2 usa antígenos liofilizados con un adyuvante de emulsión de aceite en agua pero también con adyuvante de hidróxido de aluminio, lo cual quiere decir que el enfoque de "dos viales" fue empleado para ambos adyuvantes. Esta situación contrasta con la presente invención, donde el solicitante identificó que los antígenos MenB se comportan de manera diferente con estos dos adyuvantes, dado que los antígenos MenB son estables en presencia de hidróxido de aluminio (es decir, no es necesario "dos viales"), pero eran inestables en presencia de un adyuvante de emulsión de aceite en agua. El comportamiento distinto de antígenos MenB con hidróxido de aluminio y emulsiones de aceite en agua fue la clave para el hallazgo de la presente invención, pero esta diferencia no había sido reportada por D2 para conjugados Hib or MenC. Así las cosas, nos permitimos decir que D2 no podría llevar de manera evidente a la persona medianamente versada en la

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

materia a la presente invención en combinación con D1 o con el artículo D3.

Teniendo en cuenta las diferencias expuestas anteriormente, atentamente nos permitimos decir que una persona medianamente versada en la materia no habría estado motivada a realizar un kit como el reportado en la presente invención.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *"habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares"* y *"(..) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso"*, respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

Señor Superintendente,



DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

C.C. 41.654.882 de Bogotá

T.P. 20824 del C.S.J.

mc

notificaciones@clarkemodet.com.co

Formulación dual para vacunas que comprende una emulsión de adyuvante de aceite en agua libre de sales de aluminio y un componente inmunogénico de meningitidis B en forma liofilizada

Campo de la Invención

Esta invención está en el campo de la formulación de
5 vacunas meningocócicas.

Antecedentes de la Invención

Actualmente se están investigando varias vacunas contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* ("Men-B"), pero comparten una característica común.

10 Los productos de vesícula de membrana exterior (OMV) producidos por Novartis (MENZB^{MR}), por el Instituto Finlay (VA-MENGOC-BC^{MR}), por el Instituto Noruego de Salud Pública (MENBVAC^{MR}) y por el Instituto de Vacunación de los Países Bajos (HEXAMEN^{MR} y NONAMEN^{MR}) incluyen todos un adyuvante de
15 hidróxido de aluminio. La "vacuna universal para el meningococo del serogrupo B" reportada por Novartis en la referencia 1 también incluye un adyuvante de hidróxido de aluminio, como lo hace la vacuna bivalente de OMV recientemente reportada en la referencia 2.

Breve Descripción de la Invención

20 Al desarrollar la vacuna de Men-B de Novartis, los inventores han encontrado que la inmunogenicidad óptima requiere la presencia de un adyuvante. Adicionalmente, encontraron que la adsorción a hidróxido de aluminio
25 proporciona buena estabilidad de almacenamiento para los

antígenos de la vacuna. Sin embargo, se han buscado alternativas para evitar la necesidad de usar sales de aluminio.

Es ya conocido el uso de adyuvantes sin aluminio para las vacunas de Men-B. Por ejemplo, la referencia 3 reporta el uso de la emulsión de aceite en agua, MF59, como un adyuvante para las vesículas de Men-B, y la referencia 4 describe el uso de oligonucleótidos inmunoestimuladores y/o MF59 como adyuvantes. Aunque los resultados de inmunogenicidad con MF59 fueron excelentes, la investigación continúa ha mostrado que este adyuvante puede mejorar la cobertura de cepas de una vacuna de Men-B en comparación a hidróxido de aluminio, el trabajo adicional ha mostrado inesperadamente que los inmunógenos de Men-B con adyuvante de emulsiones de aceite en agua tienen pobre estabilidad a largo plazo. De esta manera, es un objeto de la invención proporcionar maneras para mejorar la estabilidad de almacenamiento de vacunas de Men-B cuando se usan adyuvantes de emulsiones de aceite en agua.

La experiencia anterior con emulsiones de aceite en agua viene del área de las vacunas de influenza. El producto FLUAD^{MR1} incluye la emulsión MF59, y se distribuye en un

¹ Flud: Vacuna de la influenza de Novartis, Antígeno de superficie, inactivo, con adyuvante MF59C.1.

formato líquido pre-mezclado en un recipiente único (el planteamiento de "un frasco"). Esta formulación pre-mezclada es la formulación que ahora se ha encontrado que ofrece pobre estabilidad para las vacunas de Men-B.

5 Como una alternativa a la formulación de "un frasco" con vacunas de emulsión de aceite en agua, se ha usado un planteamiento de "dos frascos" para influenza (ver, por ejemplo referencia 5), para HSV (por ejemplo, referencia 6) y para VIH (por ejemplo, referencia 7), en los cuales se
10 distribuyen conjuntamente la vacuna y la emulsión, ambos en formato líquido, para mezclado extemporáneo en el punto de uso.

De acuerdo a la presente invención, se sigue un planteamiento diferente para las vacunas de Men-B, usando una
15 formulación dual de (i) un adyuvante de emulsión de aceite en agua y (ii) un componente inmunogénico de Men-B en forma liofilizada. Los antígenos liofilizados de Men-B se pueden reconstituir en forma líquida con adyuvantes en el momento del uso listo para administración a un paciente. Se ha encontrado
20 que la formulación da excelentes resultados en términos tanto de estabilidad como de inmunogenicidad.

Adicionalmente, los inventores han encontrado que el componente liofilizado puede retener eficiencia cuando se incluyen uno o más sacáridos conjugados de *N. meningitidis* en
25 los serogrupos A, C, W135 y/o Y (Men-A, -C, -W135 y -Y). Es

particularmente ventajosa la combinación de antígenos para inmunización contra múltiples serogrupos meningocócicos, incluyendo el serogrupo B, usando un componente liofilizado único.

5 De esta manera, la invención proporciona un kit que comprende: (i) un primer recipiente que contiene un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua; y (ii) un
10 segundo recipiente que contiene una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno para provocar una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N. meningitidis*. La composición antigénica liofilizada puede comprender además un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*.

La invención también proporciona un método para
15 preparar una composición inmunogénica, que comprende el paso de mezclar: (i) un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua; y (ii) una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno para provocar una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N. meningitidis*. La
20 composición antigénica liofilizada puede comprender además un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*.

La invención también proporciona una composición antigénica liofilizada que comprende (i) un inmunógeno para
25 provocar una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N.*

meningitidis, y (ii) un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*. Esta composición liofilizada es adecuada para la reconstitución por un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, y es adecuada para el uso como un componente de kit de la invención.

La composición antigénica liofilizada

La invención usa una composición antigénica liofilizada que incluye un inmunógeno para provocar una respuesta inmunitaria contra Men-B. Opcionalmente puede incluir un sacárido capsular conjugado de uno o más de Men-A, Men-C, Men-W135 y/o Men-Y.

El inmunógeno Men-B puede comprender vesículas de membrana de una bacteria de Men-B y/o proteínas recombinantes de Men-B y/o un lipo-oligosacárido (LOS) de Men-B.

Se conoce en la técnica [8] la liofilización de las OMV de Men-B, pero estas OMV se administraron subsiguientemente de manera conjunta con un adyuvante de fosfato de aluminio. No se reportó el problema de estabilidad de antígeno cuando se combinó con un adyuvante de emulsión de aceite en agua. De manera similar, se conoce la liofilización de antígenos de conjugados meningocócicos, incluyendo la reconstitución subsiguiente con MF59 [9], pero no en combinación con ningún antígeno de Men-B.

Componentes de Men-B que Comprenden Vesículas

Las vesículas para el uso como componentes de vacuna de Men-B incluyen cualquier vesícula proteoliposómica obtenida al romper una membrana exterior bacteriana para formar vesículas de la misma que incluyen componentes proteicos de la membrana exterior. De esta manera, el término incluye las OMV (referidas algunas veces como "ampollas"), microvesículas (MV [10]) y "OMV nativas" ("NOMV" [11]).

Las MV y NOMV son vesículas de membrana que se presentan de manera natural que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y se liberan en el medio de cultivo. Se pueden obtener MV al cultivar *Neisseria* en medio de cultivo de caldo, separando las células enteras de las MV más pequeñas en el medio de cultivo de caldo (por ejemplo, por filtración o por centrifugación a baja velocidad para sedimentar sólo las células y no las vesículas más pequeñas), y luego recolectando las MV del medio agotado de células (por ejemplo, por filtración, por precipitación diferencial o agregación de las MV, por centrifugación a alta velocidad para sedimentar las MV). En general se pueden seleccionar cepas para el uso en la producción de MV en base a la cantidad de MV producidas en cultivo, por ejemplo, referencias 12 y 13 describen *Neisseria* con alta producción de MV.

Se preparan artificialmente OMV a partir de bacterias, y se pueden preparar usando tratamiento con detergente (por ejemplo, con desoxicolato), o por medios no

000010

detergentes (ver, por ejemplo referencia 14). Por ejemplo, se describen en las referencias citadas en la presente los métodos para obtener preparaciones adecuadas de OMV. Las técnicas para formar OMV incluyen tratar bacterias con un
5 detergente de sal de ácido biliar (por ejemplo, sales de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido usodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc., con desoxicolato de sodio [15 y 16] que se prefiere para tratar *Neisseria*) a un pH suficientemente alto para no precipitar el
10 detergente [17]. Se pueden realizar sustancialmente otras técnicas en la ausencia de detergente [14] usando técnicas tal como tratamiento con ultrasonido, homogenización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, molienda, prensa francesa, mezclado, etc. Los métodos que usan nada o
15 poco detergente pueden retener los antígenos útiles tal como NspA [14]. De esta manera, un método puede usar un amortiguador de extracción de OMV con aproximadamente 0.5 % de desoxicolato o menos, por ejemplo, cerca de 0.2 %, aproximadamente 0.1 %, <0.05 % o cero.

20 En la referencia 18 se describe un proceso útil para la preparación de OMV y comprende la ultrafiltración en OMV crudas, en lugar de centrifugación de alta velocidad. El proceso puede comprender el paso de ultracentrifugación después de que tome lugar la ultrafiltración.

25 Se pueden preparar vesículas a partir de cualquier

000011

cepa de Men-B para el uso con la invención. Pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), de cualquier serosubtipo, y de cualquier inmunotipo (por ejemplo, L1; L2; L3; L3,3,7; L10; etc.). Los
 5 meningococos pueden ser de cualquier linaje adecuado, incluyendo linajes hiperinvasivos e hipervirulentos, por ejemplo cualquiera de los siguientes siete linajes hipervirulentos: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complejo ET-5; complejo ET-37; agrupación A4; linaje 3. Estos
 10 linajes se han definido por electroforesis enzimática multilocus (MLEE), pero también se ha usado la tipificación de secuencia multilocus (MLST) para clasificar los meningococos [referencia 19], por ejemplo, el complejo ET-37 es el complejo ST-11 por MLST, el complejo ET-5 es ST-32 (ET-5), el linaje 3
 15 es ST-41/44, etc. Se pueden preparar vesículas de cepas que tienen uno de los siguientes subtipos: P1.2; P1.2,5; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.5,c; P1.5c, 10; P1.7,16; P1.7,16b; P1.7h,4; P1.9; P1.15; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.21,16; P1.22,14.

20 Las vesículas usadas con la invención se pueden preparar de cepas tipo silvestre de Men-B o de cepas mutantes. Por ejemplo, la referencia 20 describe preparaciones de vesículas obtenidas de *N. meningitidis* con un gen *fur* modificado. La referencia 27 enseña que la expresión de *nspA*
 25 se puede favorecer con supresión concomitante de *porA* y *cps*.

000012

Los mutantes adicionales de supresión de *N. meningitidis* para la producción de OMV se describen en las referencias 27 a 29. La referencia 21 describe vesículas en las cuales se favorece la expresión de fHBP. La referencia 22 describe la
5 continuación de vesículas de cepas modificadas para expresar seis diferentes subtipos de PorA. También se puede usar [23,24] *Neisseria* mutante con bajos niveles de endotoxinas, lograda por supresión de enzimas comprendidas en la biosíntesis de LPS. Estos u otros mutantes también se pueden
10 usar con la invención.

De esta manera, una cepa de Men-B usada con la invención puede expresar en algunas modalidades más de un subtipo PorA. Se han construido anteriormente las cepas 6-valente y 9-valente de PorA. La cepa puede expresar 2, 3, 4,
15 5, 6, 7, 8 ó 9 de los subtipos de PorA: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1 y/o P1.18-1,3,6. En otras modalidades, una cepa puede haber sido reducida en expresión para la expresión de PorA, por ejemplo, en la cual se ha reducido la cantidad de PorA por
20 al menos 20 % (por ejemplo, ≥ 30 %, ≥ 40 %, ≥ 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 %, ≥ 95 %, etc.), o aún suprimido, con relación a los niveles tipo silvestre (por ejemplo, con relación a la cepa H44/76, como se describe en la referencia 30):

En algunas modalidades, la cepa de Men-B puede
25 sobreexpresar (con relación a la correspondiente cepa tipo

000013

silvestre) ciertas proteínas. Por ejemplo, las cepas pueden sobreexpresar NspA, proteína 287 [45], fHBP [21], TbpA y/o TbpB [25], Cu,Zn-superóxido dismutasa [25], etc.

En algunas modalidades, una cepa de Men-B puede
 5 incluir una o más de las mutaciones de supresión o sobreexpresión descritas en las referencias 26 a 29. Los genes preferidos para la reducción de la expresión y/o para la supresión incluyen: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB [26]; (b) CtrA, CtrB, CtrC,
 10 CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB [27]; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB [28];
 15 y (d) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, Opa, OpC, PilC, PorB, SiaD, SynA, SynB, y/o SynC [29].

Cuando se usa una cepa mutante, en algunas modalidades, puede tener una o más de las siguientes características: (i) LgtB y/o GalE reducidos en expresión o
 20 reducidos para truncar la LOS meningocócica; (ii) TbpA favorecido en expresión; (iii) Hsf favorecido en expresión; (iv) Omp85 favorecido en expresión; (v) LbpA favorecido en expresión; (vi) NspA favorecido en expresión; (vii) PorA favorecido en expresión; (viii) FrpB reducido en expresión o
 25 suprimido; (ix) Opa reducido en expresión o suprimido; (x) Opc

reducido en expresión o suprimido; (xii) el complejo génico cps suprimido. Un LOS truncada puede ser una que no incluya un epitopo de sialil-lacto-N-neotetraosa, por ejemplo, puede ser un LOS deficiente en galactosa. La LOS puede no tener una
5 cadena α .

Si está presente LOS en una vesícula entonces es posible tratar la vesícula para enlazar su LOS y sus componentes proteicos (conjugación "intra-ampolla" [29]).

La invención se puede usar con mezclas de vesículas
10 de diferentes cepas. Por ejemplo, la referencia 30 describe una vacuna que comprende composiciones multivalentes de vesículas meningocócicas, que comprenden una primera vesícula derivada de una cepa meningocócica con un serosubtipo prevalente en un país de uso, y una segunda vesícula derivada
15 de una cepa que no necesita tener un serosubtipo prevalente en un país de uso. La referencia 31 también describe combinaciones útiles de diferentes vesículas. En algunas modalidades se puede usar una combinación de vesículas de cepas con dada uno de los inmunotipos L2 y L3.

20 Se pueden preparar antígenos basados en vesícula a partir de los serogrupos diferentes de Men-B (por ejemplo, la referencia 17 describe un proceso para Men-A). Por consiguiente, la invención se puede usar con vesículas preparadas de los serogrupos diferentes de Men-B (por ejemplo,
25 A, C, W135 y/o Y). Sin embargo, el foco principal es Men-B.

000015

Componentes de Men-B que Comprenden Proteínas Recombinantes

También se han reportado proteínas recombinantes para el uso como inmunógenos de vacuna contra Men-B. Por ejemplo, en las referencias 32 a 40 se reportan varios
5 antígenos. Estos antígenos se pueden usar solos o en combinaciones. Donde se combinan múltiples proteínas purificadas entonces es útil usar una mezcla de 10 o menos (por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados.

Una combinación particularmente útil de antígenos se
10 describe en las referencias 1 y 40, y de este modo una composición de la invención puede incluir 1, 2, 3, 4 ó 5 de:
(1) una proteína "NadA"; (2) una proteína "fHBP", anteriormente conocida como "741"; (3) una proteína "936"; (4) una proteína "953"; y (5) una proteína "287". Otras posibles
15 combinaciones de antígeno pueden comprender una proteína de unión a transferrina (por ejemplo, TbpA y/o TbpB) y un antígeno Hsf. Otros posibles antígenos purificados incluyen proteínas que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 650 de la referencia 32; SEQ ID NO:
20 878 de la referencia 32; SEQ ID NO: 884 de la referencia 32; SEQ ID NO: 4 de la referencia 33; SEQ ID NO: 598 de la referencia 34; SEQ ID NO: 818 de la referencia 34; SEQ ID NO: 864 de la referencia 34; SEQ ID NO: 866 de la referencia 34; SEQ ID NO: 1196 de la referencia 34; SEQ ID NO: 1272 de la
25 referencia 34; SEQ ID NO: 1274 de la referencia 34; SEQ ID NO:

000016

1640 de la referencia 34; SEQ ID NO: 1788 de la referencia 34;
SEQ ID NO: 2288 de la referencia 34; SEQ ID NO: 2466 de la
referencia 34; SEQ ID NO: 2554 de la referencia 34; SEQ ID NO:
2576 de la referencia 34; SEQ ID NO: 2606 de la referencia 34;
5 SEQ ID NO: 2608 de la referencia 34; SEQ ID NO: 2616 de la
referencia 34; SEQ ID NO: 2668 de la referencia 34; SEQ ID NO:
2780 de la referencia 34; SEQ ID NO: 2932 de la referencia 34;
SEQ ID NO: 2958 de la referencia 34; SEQ ID NO: 2970 de la
referencia 34; SEQ ID NO: 2988 de la referencia 34, o un
10 polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que:
(a) tiene 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 70 %, 80
%, 90 %, 95 %, 99 % o más) a estas secuencias; y/o (b)
comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos
de estas secuencias, en donde n es 7 ó más (por ejemplo, 8,
15 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90,
100, 150, 200, 250 ó más). Los fragmentos preferidos para (b)
comprenden un epitopo de la secuencia pertinente. Se puede
incluir más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6) de estos
polipéptidos.

20 El antígeno fHBP cae en tres variantes distintas
[39]. Un componente de Men-B de la invención puede incluir
una variante única de fHBP, pero incluirá de manera útil un
fHBP de cada una de las dos o tres variantes. De esta manera,
puede incluir una combinación de dos o tres diferentes fHBP
25 purificados, seleccionados de: (a) una primera proteína, que

000017

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos a %
 identidad de secuencia a SEQ ID NO: 1 y/o que comprende una
 secuencia de aminoácidos que consiste de un fragmento de al
 menos x aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1; (b) una segunda
 5 proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene
 al menos b % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 2 y/o que
 comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de un
 fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2;
 y/o (c) una tercera proteína, que comprende una secuencia de
 10 aminoácidos que tiene al menos c % de identidad de secuencia a
 SEQ ID NO: 3 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos
 que consiste de un fragmento de al menos z aminoácidos
 contiguos de SEQ ID NO: 3.

El valor de a es al menos 85, por ejemplo, 86, 87,
 15 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.

20 Los valores de a, b y c no se relacionan de manera
 intrínseca 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,
 25 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de y es al menos 7,

000018

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 e z no se relacionan intrínsecamente entre sí.

En algunas modalidades, las proteínas de fHBP se lipidarán, por ejemplo, a una cisteína N-término. En otras modalidades, no se lipidarán.

Una composición útil en base a las proteínas purificadas comprende una mezcla de: (i) un primer polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4; (ii) un primer polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 ó SEQ ID NO: 7; y (iii) un primer polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6. Ver referencias 1 y 40.

Componentes de Men-B que Comprenden LOS

Se han reportado vacunas meningocócicas basadas en lipooligosacárido. El LOS se puede usar en sí mismo o se puede conjugar a un portador. Cuando se conjuga, la conjugación puede ser mediante una porción de lípido A en el LOS o por cualquier otra porción adecuada, por ejemplo, sus residuos de KDO. Si la porción de lípido A de LOS está

000019

ausente entonces es esencial este enlace alternativo.

El LOS puede ser de cualquier inmunotipo, por ejemplo, L2, L3, L7, etc.

En lugar de usar el LOS nativo, se prefiere usar una
 5 forma modificada. Estas modificaciones se pueden lograr de
 manera química, pero es más conveniente suprimir las enzimas
 en el Men-B responsable de ciertas adiciones biosintéticas.
 Por ejemplo, se puede modificar LOS para remover al menos el
 Gal terminal de la unidad nativa de lacto-N-neotetraosa, y
 10 esta modificación se puede lograr al suprimir una o más de las
 enzimas pertinentes. Las enzimas responsables de adicionar
 los dos monosacáridos terminales en un LOS nativo (ácido
 siálico y galactosa) se pueden suprimir, ya sea para eliminar
 sólo la Sia terminal o para eliminar el disacárido Sia-Gal.
 15 La supresión del gen *IgtB*, por ejemplo, remueve Sia-Gal. Una
 supresión del gen *galE* también proporciona un LOS modificado,
 útil. Se puede suprimir [41] un gen de lípido A-graso-
 transferasa.

Se puede remover al menos un ácido graso O-enlazado
 20 primario del LOS [42]. El LOS que tiene un número reducido de
 cadenas acilo secundarias por molécula de LOS también se puede
 usar [43]. El LOS puede no tener una cadena α .

El LOS puede comprender GlcNAc-Hep₂fosfoetanolamina-
 KDO₂-Lípido A [44].

25 Componentes Mezclados de Men-B

000020

La invención puede usar vesículas, polipéptidos purificados o LOS como el antígeno de Men-B. También puede usar combinaciones de estos tres antígenos, por ejemplo, (i) vesículas + polipéptidos purificados; (ii) vesículas + LOS; 5 (iii) polipéptidos purificados + LOS; o (iv) vesículas + polipéptidos purificados + LOS. Se pueden hacer estas combinaciones al preparar los componentes individuales de manera separada y luego al mezclarlos. Por ejemplo, la referencia 45 describe la adición de proteínas purificadas a 10 vesículas para proporcionar una composición con eficiencia más amplia.

Serogrupos A, C, W135 e Y

Se han aprobado vacunas monovalentes conjugadas contra el serogrupo C par el uso en humanos, e incluyen 15 MENJUGATE^{MR2}, MENINGITEC^{MR3} y NEISVAC-C^{MR4}. Las mezclas de conjugados de los serogrupos A+C se conocen [46,47] y se han reportado [48-51] mezclas de conjugados de los serogrupos A+C+W135+Y, y se aprobaron en 2005 como el producto acuoso MENACTRA^{MR5}.

20 El componente liofilizado usado con la invención puede incluir uno o más conjugados de sacáridos capsulares de

² Menjugate: Vacuna conjugado de Novartis de Meningococcal Grupo C-CRM197.

³ Meningitec: Vacuna Conjugado de Pfizer de Meningococcal Serogrupo C (Diphtheria CRM197 Protein).

⁴ NeisVac-C: vacuna conjugado absorbido de GlaxoSmithkline de Meningococcal Grupo C-TT.

25 ⁵ Menactra: Vacuna conjugado de polisacárido de difteria toxoide Meningococcal de Sanofi Pasteur (Grupos A, C, Y and W-135).

1, 2, 3 ó 4 de los serogrupos A, C, W135 e Y meningocócicos, por ejemplo, A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, A+W135+Y, A+C+W135+Y, etc. Se prefieren los componentes que incluyen sacáridos de los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y.

El sacárido capsular del serogrupo A de meningococo es un homopolímero de ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-enlazado-N-acetil-D-mannosamina-1-fosfato, con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La acetilación en la posición C-3 puede ser de 70-95 %.

10 Las condiciones usadas para purificar el sacárido pueden dar por resultado la des-O-acetilación (por ejemplo, bajo condiciones básicas), pero es útil para retener OAc en esta posición C-3. En algunas modalidades, al menos 50 % (por ejemplo, al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) de los

15 residuos de mannosamina en un sacárido del serogrupo A están O-acetiladas en la posición C-3. Se pueden reemplazar los grupos acetilo con grupos bloqueadores para impedir la hidrólisis [52], y estos sacáridos modificados aún son sacáridos del serogrupo A dentro del significado de la

20 invención.

El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico ($\alpha 2 \rightarrow 9$)-enlazado (ácido N-acetil-neuramínico, o "NeuNAc"). La estructura del sacárido se escribe como $\rightarrow 9$)-Neu p NAc 7/8 OAc-($\alpha 2 \rightarrow$. La mayoría de

25 las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o

000022

C-8 de los residuos de ácido siálico, pero cerca del 15 % de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [53,54]. La presencia o ausencia de grupos OAc genera epitopos únicos, y la especificidad de la unión del anticuerpo al sacárido puede afectar su actividad bactericida contra las cepas O-acetiladas (OAc+) y des-O-acetiladas (OAc-) [55-57]. Los sacáridos del serogrupo C usados con la invención se pueden preparar de ya sea las cepas OAc+ u OAc-. Las vacunas licenciadas del conjugado de Men-C incluyen sacáridos tanto OAc- (NEISVAC-C^{MR}) y OAc+ (MENJUGATE^{MR} y MENINGITEC^{MR}). En algunas modalidades, las cepas para la producción de los conjugados del serogrupo C son cepas OAc+, por ejemplo, del serotipo 16, serosubtipo Pl.7a,1, etc. De esta manera, se pueden usar las cepas C:16:Pl.7a,1 OAc+. También son útiles las cepas OAc+ en el serosubtipo Pl.1, tal como la cepa C11.

El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades disacáridas de ácido siálico-galactosa. Al igual que el sacárido del serogrupo C, tiene O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [58]. La estructura se escribe como: $\rightarrow 4) -D -Neup5Ac(7/9OAc) -\alpha - (2 \rightarrow 6) -D -Gal -\alpha - (1 \rightarrow$.

El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que las unidades repetitivas del disacárido incluyen glucosa en lugar de galactosa. Al igual que el serogrupo W135, tiene O-acetilación variable en las

000023

posiciones 7 y 9 de ácido siálico [58]. La estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4)$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 $\rightarrow$ 6)-D-Glc- α -(1 $\rightarrow$).

Los sacáridos usados de acuerdo a la invención pueden estar O-acetilados como se describe anteriormente (por ejemplo, con el mismo patrón de O-actilación como se ve en los sacáridos capsulares nativos), o pueden estar parcial o totalmente des-O-acetilados en una o más posiciones de los anillos de sacárido, o pueden estar hiper-O-acetilados con relación a los sacáridos capsulares nativos.

Las porciones de sacárido en los conjugados pueden comprender sacáridos de longitud completa como se prepara de meningococos, y/o pueden comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa, es decir, los sacáridos pueden ser más cortos que los sacáridos capsulares nativos vistos en las bacterias. Los sacáridos de esta manera se pueden despolimerizar, con la despolimerización que se presenta durante o después de la purificación del sacárido pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de cadena de los sacáridos. Un método de despolimerización comprende el uso de peróxido de hidrógeno [48]. Se adiciona peróxido de hidrógeno a un sacárido (por ejemplo, a una concentración final de H₂O₂ de 1 %), y entonces se incuba la mezcla (por ejemplo, a aproximadamente 55°C) hasta que se ha logrado una reducción deseada de longitud de cadena. Otro

000024

método de despolimerización comprende hidrólisis ácida [49]. En la técnica se conocen otros métodos de despolimerización. Los sacáridos usados para preparar conjugados para el uso de acuerdo a la invención se pueden obtener por cualquiera de estos métodos de despolimerización. Se puede usar despolimerización a fin de proporcionar una longitud óptima de cadena para inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de cadena para manejabilidad física de los sacáridos. En algunas modalidades, los sacáridos tienen el siguiente intervalo de grados promedio de polimerización (Dp): A=10-20; C=12-22; W135=15-25; Y=15-25. En términos de peso molecular, en lugar de Dp, los intervalos útiles son, para todos los serogrupos: <100kDa; 5kDa-75kDa; 7kDa-50kDa; 8kDa-35kDa; 12kDa-25kDa; 15kDa-22kDa.

En algunas modalidades, el peso molecular promedio para los sacáridos de cada uno de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y puede ser más de 50kDa, por ejemplo, $\geq 75\text{kDa}$, $\geq 100\text{kDa}$, $\geq 110\text{kDa}$, $\geq 120\text{kDa}$, $\geq 130\text{kDa}$, etc. [59], y aún hasta 1500kDa, en particular como se determina por MALLS. Por ejemplo, un sacárido de Men-A puede estar en el intervalo de 50-500kDa, por ejemplo, 60-80kDa; un sacárido de Men-C puede estar en el intervalo de 100-210kDa; un sacárido de Men-W135 puede estar en el intervalo de 60-190kDa, por ejemplo, 120-140kDa; y/o un sacárido de Men-Y puede estar en el intervalo de 60-190kDa, por ejemplo, 150-160kDa.

La masa del sacárido meningocócico por serogrupo en la vacuna reconstituida usualmente estará entre 1µg y 20µg, por ejemplo, entre 2 y 10 µg por serogrupo, o aproximadamente 4µg o aproximadamente 5µg o aproximadamente 10µg. Donde se incluyen conjugados de más de un serogrupo, pueden estar presentes a masas sustancialmente iguales, por ejemplo, la masa del sacárido de cada serogrupo está dentro de +10 % uno del otro. Como una alternativa a una relación igual, se puede usar una doble masa del sacárido del serogrupo A. De esta manera, una vacuna puede incluir el sacárido Men-A a 10 µg y los sacáridos de Men-C, -W135 y -Y a 5µg cada uno.

Las proteínas portadoras preferidas son toxinas bacterianas, tal como toxinas de difteria o tétano, o toxoides o mutantes de los mismos. Estas se usan comúnmente en vacunas conjugadas. El mutante de toxina de difteria CRM₁₉₇ es particularmente preferido [60]. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen el complejo de proteína de membrana exterior de *N.meningitidis* [61], péptidos sintéticos [62,63], proteínas de choque térmico [64,65], proteínas de pertussis [66,67], citocinas [68], linfocinas [68], hormonas [68], factores de crecimiento [68], proteínas artificiales que comprenden múltiples epitopos de células T CDR+ humanas de varios antígenos derivados de patógenos [69] tal como N19 [70], proteína D de *H.influenzae* [71-73], pneumolisina [74] o sus derivados no tóxicos [75], proteína PspA de superficie

000026

pneumocócica [76], proteínas de captación de hierro [77], toxina A o B de *C.difficile* [78], exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (rEPA) [79], etc. Una proteína portadora única puede portar sacáridos de múltiples serogrupos diferentes [80], pero este arreglo no se prefiere. Donde el componente liofilizado incluya conjugados de más de un serogrupo meningocócico entonces los varios conjugados pueden usar diferentes proteínas portadoras (por ejemplo, un serogrupo en CRM197, otro en el toxoide de tétanos) o pueden usar la misma proteína portadora (por ejemplo, sacáridos de dos serogrupos conjugados separadamente en CRM197 y luego combinados).

Se pueden usar conjugados con una relación de sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso), por ejemplo, relaciones entre 1:2 y 5:1 y relaciones entre 1:1.25 y 1:2.5. Como se describe en la referencia 81, diferentes conjugados de serogrupos meningocócicos en una mezcla pueden tener diferentes relaciones de sacárido:proteína, por ejemplo, uno puede tener una relación de entre 1:2 y 1:5, en tanto que otro tiene una relación entre 5:1 y 1:1.99.

Son útiles los sacáridos y conjugados que tienen las características descritas en la referencia 82.

La molécula portadora se puede conjugar covalentemente al sacárido meningocócico directamente o

mediante un ligador. Se conocen varios ligadores, por ejemplo, un ligador de ácido adípico, que se puede formar al acoplar un grupo -NH_2 libre (por ejemplo, introducido a un sacárido por aminación) con ácido adípico usando, por ejemplo, 5 activación con diimida), y luego al acoplar una proteína al compuesto intermedio resultante de sacárido-ácido adípico [83, 84]. Otro tipo preferido de enlace es un ligador de carbonilo, que se puede formar por la reacción de un grupo hidroxilo libre de un sacárido con CDI [85, 86] seguido por la 10 reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Otros ligadores incluyen β -propionamido [87], nitrofenil-etilamina [88], haluros de haloacilo [89], enlaces glicosídicos [90], ácido 6-aminocaproico [91], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [92], dihidrazida de 15 ácido adípico ADH [93], porciones de 4 a 12 átomos de carbono [94], etc. También se puede usar condensación con carbodiimida [95].

Como se describe en la referencia 96, una mezcla puede incluir un conjugado con un enlace directo de 20 sacárido/proteína y otro conjugado con enlace mediante un ligador. Este arreglo aplica particularmente cuando se usan conjugados de sacárido de diferentes serogrupos meningocócicos, por ejemplo, los sacáridos de Men-A y Men-C se pueden conjugar mediante un ligador, en tanto que los 25 sacáridos de Men-W135 y Men-Y se pueden conjugar directamente

a una proteína portadora.

Donde una composición incluye uno o más de los conjugados de Men-A, -C, -W y/o -Y, en algunas modalidades, pueden incluir ventajosamente también un conjugado de Hib (ver 5 más adelante). Donde una composición incluye un sacárido de más de un serogrupo meningocócico, hay una masa promedio de sacárido por serogrupo. Si se usan masas sustancialmente iguales de cada serogrupo entonces la masa promedio será la misma como cada masa individual; donde se usan masas no 10 iguales entonces el promedio será diferente, por ejemplo, con una cantidad de 10:5:5:5 µg para una mezcla de Men-ACWY, la masa promedio es 6.25µg por serogrupo. Si también se incluye un sacárido de Hib, entonces, en algunas modalidades, la masa será sustancialmente la misma como la masa promedio del 15 sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas modalidades, la masa del sacárido de Hib será más que (por ejemplo, al menos 1.5x), la masa promedio del sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas modalidades, la masa del sacárido de Hib será menos que (por ejemplo, al menos 1.5x) la masa 20 promedio del sacárido meningocócico por serogrupo [97].

El Adyuvante de Emulsión de Aceite en Agua

Se conocen varios adyuvantes de emulsión de aceite en agua, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un agente tensioactivo, con los aceites y agentes 25 tensioactivos que son biodegradables (metabolisables) y

biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión en general son de menos de 5µm de diámetro, y pueden tener aún un diámetro de sub-micras, con estos pequeños tamaños que se logran con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Las gotas con un tamaño de menos de 220 nm se prefieren puesto que se pueden someter a esterilización por filtro.

La invención se puede usar con aceites tal como aquellos de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Las fuentes para aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. Aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nueces. Se puede usar aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de ajonjolí y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros cereales tal como trigo, avena, arroz, centeno, de teff, de triticale y similares. Se pueden preparar ésteres de ácidos grasos de 6-10 átomos de carbono de glicerol y 1,2-propanodiol, en tanto que no se presente de manera natural en los aceites de semilla, mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados iniciando de los aceites de nueces y semillas. Las grasas y aceites de leche mamífera son

000030

metabolizables y por lo tanto se pueden usar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los pescados contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como de esperma, ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 átomos de carbono y en general se refieren como terpenoides. Los aceites de hígado de tiburón contienen terpenoides insaturados, ramificados conocidos como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en la presente. El escualeno, el análogo saturado a escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, se obtienen fácilmente de fuentes comerciales o se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles. Se pueden usar mezclas de aceites.

Donde una composición incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero se prefieren los α -tocoferoles. El tocoferol puede tomar varias

000031

formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tal como succinato, acetato, nicotinato, etc. Se pueden usar tanto D- α -tocoferol como DL- α -tocoferol. Un α -tocoferol preferido es DL- α -tocoferol, y la
 5 sal preferida de este tocoferol es el succinato.

Se pueden clasificar los agentes tensioactivos por su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los agentes tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y de manera más
 10 preferente al menos 16. La invención se puede usar con agentes tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los agentes tensioactivos de ésteres de polioxietilen-sorbitan (referidos comúnmente como Tweens⁶), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80); copolímeros de óxido de etileno (EO),
 15 óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), vendidos bajo el nombre comercial DOWFAX^{MR7}, tal como los copolímeros de bloque de EO/PO; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos repetitivos de etoxi (oxi-1,2-etanodiilo), con octoxinol-9 (Triton X-100⁸, o t-octilfenoxipolietoxietanol)
 20 que son de interés particular; (octilfenoxi)polietoxietanol

⁶ Polietilen glicol sorbitan monolaurato, poliosietilensorbitan monolaurato Tween 80 = Polisorbato 80

⁷ Surfactante no iónico producido por polimerización de óxido de etileno, óxido de propileno, y/o óxido de butileno en la misma molécula.

25 ⁸ T-octilfenoxipolietoxietanol, polietilen glicol tert-octilfenil éter, polioxietileno (10) isoocetilgenil eter

(IGEPA⁹ CA-630/NP-40¹⁰; fosfolípidos tal como fosfatidilcolina (lecitina); ésteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como agentes tensioactivos Brij¹¹), tal como
 5 trietilenglicol-monolauril-éter (Brij 30); y ésteres de sorbitan (comúnmente conocidos como los SPAN), tal como trioleato de sorbitan (Span 85) y monolaurato de sorbitan. Los agentes tensioactivos preferidos para inclusión en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietilen-sorbitan),
 10 Span 85 (trioleato de sorbitan), lecitina y Triton X-100.

Se pueden usar mezclas de agentes tensioactivos, por ejemplo, Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilen-sorbitan tal como monooleato de polioxietilen-sorbitan (Tween 80) y un octoxinol
 15 tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth-9 más un éster de polioxietilen-sorbitan y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de los agentes tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietilen-sorbitan (tal como Tween 80) de 0.01 a 1 %, en particular
 20 aproximadamente 0.1 %; octil- o nonilfenoxi-polioxietanoles (tal como Triton X-100, u otros detergentes en la serie

⁹ (Octilfenoxi)polietoxietanol, octilfenil-polietilen glicol

25 ¹⁰ NP-40: Nonident -P40, octilfenoxipolietoxietanol

¹¹ Polietilen glicol hexadecil éter.

Triton) de 0.001 a 0.1 %, en particular de 0.005 a 0.02 %; éteres de polioxietileno (tal como laureth 9) de 0.1 a 20 %, preferentemente de 0.1 a 10 % y en particular de 0.1 a 1 % o aproximadamente 0.5 %.

5 Los adyuvantes específicos de emulsión de aceite en agua útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión en sub-micrones de escualeno, Tween 80, y Span¹² 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente 5 % de escualeno, aproximadamente 10 0.5 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0.5 % de Span 85. En términos de peso, estas relaciones llegarán a ser 4.3 % de escualeno, 0.5 % de polisorbato 80 y 0.48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como "MF59" [98-100], como se describe en más detalle en el Capítulo 10 de la referencia 101 y en el 15 capítulo 12 de la referencia 102. La emulsión MF59 puede incluir iones de citrato, por ejemplo, amortiguador de citrato de sodio 10 mM.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina amortiguada con 20 fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de tocoferol y de 0.3 a 3 % de Tween 80, y la relación en peso de escualeno:tocopherol es

25 ¹² SPAN: Sorbitan trioleato

preferentemente ≤ 1 puesto que esto proporciona una emulsión más estable. Pueden estar presentes escualeno y Tween 80 a una relación en volumen de aproximadamente 5:2. Esta emulsión se puede producir al disolver Tween 80 en PBS para dar una
5 solución al 2 %, luego mezclar 90 ml de esta solución con una mezcla de (5g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), luego microfluidizar la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite en sub-micrones, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente cerca de 180
10 nm.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3D-MPL. La emulsión puede contener un amortiguador de fosfato.

15 - Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación en masa de aproximadamente 75:11:10 (por
20 ejemplo, 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polisorbato 80, 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Triton X-100 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL. La
25 fase acuosa puede contener un amortiguador de fosfato.

- Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic^{MR} L121"). La emulsión se puede formular en solución salina amortiguada con fosfato, pH 7.4. Esta emulsión es un vehículo útil de distribución para dipéptidos de muranilo, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [103] (0.05-1 % de Thr-MDP, 5 % de escualeno, 2.5 % de Pluronic L121¹³ y 0.2 % de polisorbato 80). También se puede usar sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [104] (5 % de escualeno, 1.25 % de Pluronic L121 y 0.2 % de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.

- Una emulsión que comprende escualeno, un solvente acuoso, un agente tensioactivo no iónico hidrófilo de polioxietilen-alquil-éter (por ejemplo, polioxietileno (12) cetoestearil-éter) y un agente tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitan o un éster de mannida, tal como monooleato de sorbitan o "Span 80"). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos 90 % de las gotas de aceite (en volumen) con un tamaño de menos de 200 nm [105]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, una azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. Se pueden liofilizar estas emulsiones.

25 ¹³ Copolímero en bloque de Oxido de etileno/óxido de propileno

- Una emulsión que tiene de 0.5-50 % de un aceite, 0.1-10 % de un fosfolípido, y 0.05-5 % de un agente tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 106, los componentes preferidos de fosfolípido son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Son ventajosos los tamaños sub-micrónicos de gotas.

- Una emulsión en sub-micrones de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un agente tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Los aditivos pueden incluir, tal como saponina QuilA¹⁴, colesterol, un conjugado lipófilo a saponina (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 107, producido por la adición de amina alifática a desacilsaponina mediante el grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetilidiododecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un agente tensioactivo hidrófilo, no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietilen-polioxipropileno) [108].

¹⁴ Quil-A: Fracción purificada extraída de la corteza del árbol de Suramérica Quillaja Saponaria Molina.

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado, hidrófilo, no iónico, y un agente tensioactivo lipófilo, no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [108].

- Una emulsión en la cual una saponina (por ejemplo, Quila o QS21¹⁵) y un esterol (por ejemplo, un colesterol) se asocian como micelas helicoidales [109].

Se pueden usar emulsiones de aceite en agua como adyuvantes o en sí mismos, o como portadores para compuestos inmunoestimuladores adicionales, por ejemplo, oligonucleótidos inmunoestimuladores, 3d-MPL, etc.

El 3dMPL (también conocido como monofosforil-lípido A 3-des-O-acetilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil-lípido A) es un adyuvante en el cual se ha desacilado la posición 3 de la glucosamina de extremo reductor en el monofosforil-lípido A. Se ha preparado 3dMPL a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A pero carece de un grupo fosforil lábil a ácido y un grupo acil labil a base. En la referencia 10 se describe originalmente la preparación de 3dMPL.

Reconstitución y Envasado

¹⁵ Fracción de saponina purificada extraída del árbol de Suramérica Quillaja saponaria Molina

Finalmente, los componentes liofilizados de antígeno de la invención se reconstituirán con un componente líquido para dar un material adecuado para la administración a un paciente. La reconstitución tomará lugar típicamente en el punto de uso. De esta manera, un antígeno y un adyuvante de emulsión de aceite en agua, se pueden mantener de manera separada, en un kit de vacuna, envasado o distribuido, listo para formulación final en el momento de uso.

En un kit que contiene dos recipientes, uno incluirá el líquido para reconstitución y el segundo recipiente incluye el material liofilizado. El segundo recipiente usualmente se sellará de manera hermética. El líquido se introducirá usualmente en el segundo recipiente mediante una primera aguja, reconstituyendo de este modo el material liofilizado en una forma líquida. El líquido entonces se retirará, usualmente en una jeringa, para la administración a un paciente. Este paso de retiro puede ser mediante la primera aguja, pero frecuentemente es mediante una segunda aguja. La aguja usada para el retiro puede ser la misma aguja que la que se usa para la inyección del paciente, o puede ser diferente.

El segundo recipiente será típicamente un frasco. Una emulsión de aceite en agua para reconstituir el material liofilizado también puede estar localizada en un frasco pero, como alternativa, puede estar localizada en una jeringa. Un arreglo adicional tiene el primero y segundo recipientes como

cámaras separadas en una jeringa de doble cámara tal que, cuando se acciona, se introduce material líquido desde el primer recipiente al segundo recipiente. Los materiales mezclados y reconstituidos entonces pueden salir de la jeringa en forma líquida. En todos los casos, sin embargo, se mantienen separados los materiales liofilizados y líquidos, hasta que estén listos para el mezclado.

Aunque usualmente se usará una emulsión de aceite en agua en su forma líquida, en algunas modalidades de la invención, es posible usar un adyuvante liofilizado de emulsión de aceite en agua. La liofilización de los adyuvantes de emulsión de esta manera se describe, por ejemplo, en la referencia 105 y 111. Estas emulsiones secas se reconstituirán aún en forma líquida en el momento del uso, por ejemplo, usando un portador acuoso. El adyuvante liofilizado y los componentes liofilizados de antígeno pueden ser componentes separados del kit, pero en algunas modalidades, se pueden mezclar (ya sea antes o después de la liofilización) en la forma liofilizada. De esta manera, en algunas modalidades, la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de una emulsión liofilizada de aceite en agua y una composición liofilizada antigénica que comprende un inmunógeno para provocar una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. Esta composición liofilizada, mezclada se puede mezclar con un portador acuoso

000040

para dar en un paso de reconstitución una composición de Men-B con un adyuvante de emulsión de aceite en agua.

De esta manera, un kit puede comprender, por ejemplo, dos frascos, uno, una jeringa ya rellena y un frasco, 5 etc. Una jeringa incluirá en general una dosis única de la composición, en tanto que un frasco puede incluir una dosis única o múltiples dosis. Para múltiples formas de dosis, por lo tanto, se prefieren frascos a las jeringas pre-rellenas.

También se pueden adicionar materiales líquidos y/o 10 liofilizados adicionales antes de la administración a un paciente.

Un recipiente para un componente liofilizado puede tener una tapa (por ejemplo, un seguro Luer) adaptada tal que se pueda insertar una jeringa pre-rellena en la tapa, los 15 contenidos de la jeringa se puedan expulsar al frasco para reconstituir el material liofilizado, en el mismo, y los contenidos del frasco se puedan remover de regreso a la jeringa. Después de la remoción de la jeringa del frasco, entonces se puede unir una aguja y se puede administrar la 20 vacuna a un paciente. La tapa puede estar localizada dentro de un sello o cubierta, tal que el sello o cubierta se tenga que remover antes de que se pueda tener acceso a la tapa.

Donde un componente se envasa en un frasco, éste se hace preferentemente de un material de vidrio o plástico. El 25 frasco se esteriliza preferentemente antes de que se adicione

000041

al mismo el material. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, se pueden sellar los frascos con un tapón libre de látex. El frasco puede incluir una dosis única de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un frasco de 5 "múltiples dosis"), por ejemplo, 10 dosis. Los frascos preferidos se hacen de vidrio incoloro.

Donde la vacuna se envasa en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a la misma, o puede estar libre de aguja. Se puede suministrar una aguja separada con la jeringa 10 para montaje y uso. Se prefieren las agujas de seguridad. Son típicas las agujas de calibre 23 de 2.54 centímetros (1 pulgada), de calibre 25 de 2.54 centímetros (1 pulgada) y de calibre 25 de 1.59 centímetros (5/8 de pulgada). Se pueden proporcionar jeringas con etiquetas desprendibles en las 15 cuales se pueden imprimir el número de lote y la fecha de vencimiento de los contenidos, para facilitar el mantenimiento del registro. El émbolo en la jeringa tiene preferentemente un tapón para impedir que el émbolo se remueva accidentalmente durante la aspiración.

20 Donde se use un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringa o un frasco), entonces se prefiere usar un recipiente producido de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de sosa y cal.

Puesto que las vacunas se administran usualmente a 25 pacientes en dosis de 0.5 ml, el volumen del líquido en el

000042

primer recipiente será adecuado para dar un volumen de dosis después de la reconstitución de al menos 0.5 ml, por ejemplo, 0.6 ml, que da cuenta del volumen de desperdicio.

Por razones de estabilidad, el componente liofilizado de la invención puede incluir un estabilizador tal como lactosa, sacarosa y/o manitol, así como mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc. El uso de una mezcla de sacarosa/manitol puede acelerar el proceso de secado. Un componente liofilizado también puede incluir cloruro de sodio. Los componentes solubles en el material liofilizado se retendrán en la composición después de la reconstitución, y de este modo las vacunas líquidas finales de esta manera pueden contener lactosa y/o sacarosa.

Una composición puede incluir un agente protector de temperatura, como se describe en la referencia 112. Los ejemplos incluyen glicerina, propilenglicol, y/o polietilenglicol (PEG). Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular promedio que varía desde 200-20,000 Da. En una modalidad preferida, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 300 Da ("PEG-300").

Composiciones Farmacéuticas

Los materiales de la invención se usarán finalmente para preparar composiciones farmacéuticas para la administración a un paciente. Estos incluirán típicamente un

portador farmacéuticamente aceptable. En la referencia 113 está disponible un análisis completo de los portadores farmacéuticamente aceptables.

Se pueden establecer por rutina los volúmenes efectivos de dosis, pero típicamente una dosis humana típica de la composición tiene un volumen de aproximadamente 0.5 ml, por ejemplo, para inyección intramuscular. La vacuna basada en OMV de RIVM se administró en un volumen de 0.5 ml [114] por inyección intramuscular al brazo tenso o superior. Se administra MeNZB^{MR} en una inyección intramuscular de 0.5 ml a la región tensa anterolateral o deltoide del brazo. Se pueden usar dosis similares para otras rutas de distribución, por ejemplo, una vacuna intranasal basada en OMV para atomización puede tener un volumen de aproximadamente 100 µl o aproximadamente 130 µl por aspersión, con cuatro aspersiones administradas para dar una dosis total de aproximadamente 0.5 ml.

El pH de una composición después de la reconstitución está preferentemente entre 6 y 8, y de manera más preferente entre 6.5 y 7.5 (por ejemplo, cerca de 7). El pH de la vacuna basada en OMV de RIVM es de 7.4 [115], y se prefiere un pH <7.5 para las composiciones de la invención. La vacuna basada en OMV de RIVM mantiene el pH al usar un amortiguador de Tris/HCl 10mM, y el pH estable en las composiciones de la invención se pueden mantener por el uso de

000044

un amortiguador, por ejemplo, un amortiguador Tris, un amortiguador de citrato, amortiguador de fosfato, o un amortiguador de histidina. De esta manera, las composiciones de la invención incluirán en general un amortiguador. Los
5 componentes del amortiguador se colocarán en el componente líquido y/o componente liofilizado, como sea apropiado, para dar el arreglo final de post-reconstitución, como se desee.

La composición puede ser estéril y/o estar libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser
10 isotónicas con respecto a los humanos.

Las composiciones de la invención para administración a pacientes son inmunogénicas, y son más preferentemente composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo a la invención pueden ser ya sea profilácticas (es
15 decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de antígenos, así como cualquier otro componente, como se
20 necesite. Por "cantidad inmunológicamente efectiva", se quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del
25 individuo que se trate, de la edad, del grupo taxonómico del

000045

individuo que se trate (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunológico del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado deseado de protección, de la formulación de vacuna, de la valoración del doctor tratante de la situación médica, y de otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad caerá en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos de rutina. El contenido de antígeno de las composiciones de la invención se expresará en general en términos de la cantidad de proteína por dosis. Una dosis de aproximadamente 0.9 mg de proteína por ml es típica para vacunas intranasales basadas en OMV.

Los meningococos afectan varias áreas del cuerpo y de este modo se pueden preparar las composiciones de la invención en varias formas líquidas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como productos inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones. La composición se puede preparar para administración pulmonar, por ejemplo, por un inhalador, usando una aspersion fina. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como aspersion o gotas. Son típicos los productos inyectables para administración intramuscular.

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se envasa en un formato de múltiples dosis. En las vacunas se encuentran comúnmente

000046

los antimicrobianos tal como tiomersal y 2-fenoxietanol, pero se prefiere usar ya sea un conservador libre de mercurio o no usar para nada conservador.

Un componente liofilizado de la invención y/o un
5 adyuvante co-embasado de emulsión de aceite en agua, pueden estar sustancialmente libres de sales de aluminio. Este arreglo permite que la composición reconstituida de la invención esté sustancialmente libre de sales de aluminio.

Las composiciones de la invención pueden comprender
10 detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. En general están presentes los detergentes a bajos niveles, por ejemplo, <0.01 %.

Las composiciones de la invención pueden incluir detergente residual (por ejemplo, desoxicolato) de la
15 preparación de OMV. La cantidad de detergente residual es preferentemente menos de 0.4 µg (más preferentemente menos de 0.2 µg) por cada µg de la proteína de Men-B.

Las composiciones de la invención pueden incluir LOS de meningococo. La cantidad de LOS es preferentemente menos
20 de 0.12 µg (más preferentemente menos de 0.05 µg) por cada µg de la proteína.

Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Una concentración de 10±2 mg/ml de NaCl es típica,
25 por ejemplo cerca de 9 mg/ml.

000047

Métodos de Tratamiento

La invención también proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica líquida de la invención al mamífero. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente comprende anticuerpos. El método puede provocar una respuesta de refuerzo en un paciente que se ha cebado ya contra *N.meningitidis*. En la referencia 116 se describen regímenes de cebadura/refuerzo, subcutáneos e intranasales para los OMV.

El mamífero es preferentemente un humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño que empieza a andar o un infante) o un adolescente; donde la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferentemente un adulto. También se puede administrar una vacuna propuesta para niños a los adultos, por ejemplo, para valorar la seguridad, dosis, inmunogenicidad, etc.

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

La invención también proporciona el uso de composiciones y mezclas de la invención en la elaboración de

000048

un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero. La invención también proporciona el uso de (i) un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua; y (ii) una composición antigénica liofilizada que comprende un
5 inmunógeno para provocar una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N.meningitidis*, en la elaboración de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El uso también puede comprender (iii) un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos A, C, W135
10 y/o Y de *N.meningitidis*.

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

15 Una manera de verificar la eficiencia del tratamiento terapéutico comprende monitorizar la infección Neisserial después de la administración de la composición de la invención. Una manera de verificar la eficiencia del tratamiento profiláctico comprende monitorizar las respuestas
20 inmunitarias contra antígenos después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención se puede determinar al administrarles a sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos de animales [117]) y luego al determinar los parámetros
25 normales incluyendo anticuerpos bacterias serosos (SBA) y

títulos de ELISA (GMT). Estas respuestas inmunitarias se determinarán en general alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán a los valores determinados antes de la administración de la
5 composición. Un incremento de SBA de al menos 4 veces u 8 veces se prefiere. Cuando se administra más de una dosis de la composición, se puede hacer más de una determinación después de la administración.

En general, las composiciones de la invención son
10 capaces de inducir respuestas serosas de anticuerpos bactericidas después que se administran a un sujeto. Estas respuestas se miden convenientemente en ratones y son un indicador normal de la eficiencia de la vacuna. La actividad bactericida serosa (SBA) mide la aniquilación bacteriana
15 mediada por el complemento, y se puede valorar usando complemento de humano o conejo neonatal. Las normas de la WHO requieren que una vacuna induzca al menos un aumento de 4 veces en la SBA en más del 90 % de los receptores. MeNZB^{MR} produce un aumento de 4 veces en la SBA 4-6 semanas después de
20 la administración de la tercera dosis.

Las composiciones preferidas pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente humano que es superior al criterio de seroprotección para un porcentaje aceptable de sujetos. Los antígenos con un título asociado de anticuerpo
25 por arriba del cual se considera un hospedador como

000050

seroconvertido contra el antígeno, son bien conocidos, y estos títulos se publican por organizaciones tal como WHO. De manera preferente, más del 80 % de una muestra estadísticamente significativa de sujetos se seroconvierte, de
5 manera más preferente más del 90 %, de manera más preferente más del 93 % y de manera más preferente 96-100 %.

Las composiciones de la invención se administrarán en general de manera directa a un paciente. Se puede lograr la distribución directa por inyección parenteral (por ejemplo,
10 de manera subcutánea, intraperitonealmente, de manera intravenosa, intramuscularmente, o al espacio intersticial de un tejido) o por cualquier otra ruta adecuada. La invención se puede usar para producir inmunidad sistémica y/o mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al brazo tensado o
15 superior. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, aguja hipodérmica), pero se usa de manera alternativa inyección libre de aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0.5 ml.

El tratamiento de dosis puede ser un programa de
20 dosis única o un programa de múltiples dosis. Se pueden usar múltiples dosis en un esquema de inmunización primaria y/o en un esquema de inmunización de refuerzo. Se puede seguir un programa de dosis primaria por un programa de dosis de refuerzo. La sincronización adecuada entre las dosis de
25 cebadura (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la

000051

cebadura y el refuerzo, se pueden determinar por rutina. La vacuna de RIVM basada en OMV se probó usando un programa primario de 3 ó 4 dosis, con vacunación a los 0, 2 y 8 ó 1, 2 y 8 meses. Se administra MeNZB^{MR} como tres dosis a intervalos
5 de seis semanas.

Las composiciones de la invención se pueden usar para inducir respuestas de anticuerpos bactericidas contra un linaje más que hipervirulento de meningococo. En particular, pueden inducir preferentemente respuestas bactericidas contra
10 dos o tres de los siguientes tres linajes hipervirulentos: (i) agrupación de A4; (ii) complejo de ET5; y (iii) linaje 3. Pueden inducir adicionalmente respuestas de anticuerpos bactericidas contra uno o más de los linajes hipervirulentos subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y
15 contra otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Esto no significa necesariamente que la composición pueda inducir anticuerpos bactericidas contra cada una de las cepas de meningococo dentro de estos linajes hipervirulentos, sino más bien para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas de
20 meningococo dentro de un linaje hipervirulento particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos 50 % (por ejemplo, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) del grupo. Los grupos preferidos de cepas incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países:
25 GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR, y CU. El suero tiene

preferentemente un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o mayor, preferentemente 2^{14}), por ejemplo, el suero es capaz de aniquilar al menos 50 % de las bacterias de prueba de una cepa particular cuando se diluye 1/1024.

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

Las cepas 961-5945 y G2136 son ambas de las cepas de referencia de MLST de *Neisseria* [ids 638 y 1002 en la referencia 118]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (por ejemplo, ATCC BAA-335) y fue la cepa secuenciada en la referencia 119. Se ha usado ampliamente y se caracterizado la cepa 44/76 (por ejemplo, referencia 120) y es una de las cepas de referencia de MLST de *Neisseria* [id 237 en referencia 118; fila 32 de la Tabla 2 en referencia 19]. La cepa 394/98 se aisló originalmente en Nueva Zelanda en 1998, y se han publicado varios estudios que usan esta cepa (por ejemplo, referencia 121 y 122). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia de MLST (id 409 en referencia 118; fila 41 de Tabla

000053

2 en referencia 19).

Composiciones Adicionales de la Invención

La invención proporciona una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno para provocar una
5 respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N.meningitidis*, en donde el inmunógeno comprende vesículas de membrana exterior de Men-B como se describe anteriormente, con la condición que la composición no incluya vesículas de ninguna de las cepas: F91; JB10124; o HP10124.

10 La invención proporciona una composición antigénica, liofilizada que comprende un inmunógeno para provocar una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N.meningitidis*, en donde el inmunógeno comprende vesículas de membrana exterior de Men-B como se describe anteriormente, en donde las
15 vesículas son de una cepa con un inmunotipo L2 o L3. La composición puede incluir vesículas tanto de la cepa L2 como L3.

La invención proporciona una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno para provocar una
20 respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N.meningitidis*, en donde el inmunógeno comprende vesículas de membrana exterior de Men-B como se describe anteriormente, en donde las vesículas incluyen LOS que no incluye un epitopo de sialil-lacto-N-notetraosa.

25 La invención proporciona una composición antigénica

000054

liofilizada que comprende un inmunógeno para provocar una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N.meningitidis*, en donde el inmunógeno comprende una proteína fHBP purificada. La composición puede incluir más de una variante de fHBP, como
5 se describe anteriormente.

Estas composiciones liofilizadas son adecuadas para la reconstitución por un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, de esta manera son adecuadas para el uso como componentes de kit de la invención o para el uso en los
10 métodos de la invención, etc. Puesto que se pueden vender o distribuir sin adyuvantes de emulsión, sin embargo, son modalidades independientes de la invención. Sin embargo, se pueden envasar en forma de kit en combinación con otro recipiente que comprende un adyuvante líquido. Este adyuvante
15 líquido comprende de manera preferente una emulsión de aceite en agua.

La invención también proporciona una composición antigénica con adyuvante que comprende vesículas de membrana del serogrupo B de *N.meningitidis* y una emulsión en sub-micras
20 de aceite en agua. La emulsión comprende de manera preferente escualeno y/o polisorbato 80. Las gotas de aceite de la emulsión son idealmente de un diámetro <500 nm. Las vesículas pueden sobreexpresar una o más proteínas como se analiza anteriormente, y/o pueden incluir una o más de las mutaciones
25 de supresión como se analiza anteriormente, por ejemplo, LgtB

y/o GalE reducidos en expresión o suprimidos para truncar LOS, TbpA favorecido en expresión, etc. Se puede usar una conjugación "intra-ampolla". Esta composición con adyuvante se puede preparar al mezclar antígenos liofilizados con una emulsión, como se describe anteriormente, o en contraste se puede preparar al usar preparación acuosa de vesículas.

Componentes Antigénicos Adicionales

Así como contienen antígenos de *N.meningitidis*, las composiciones pueden incluir antígenos de patógenos adicionales. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, tal como un sacárido (típicamente conjugado)
- un antígeno de virus de hepatitis B, tal como el antígeno superficial HBsAg,
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B.pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3,
- un antígeno de difteria, tal como toxoide de difteria,
- un antígeno de tétanos, tal como toxoide de tétanos,
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B (Hib), típicamente conjugado,

000056

- antígenos inactivados de poliovirus.

Estos antígenos adicionales se pueden incluir en forma líquida en el mismo recipiente como la emulsión de aceite en agua, en forma liofilizada en el mismo recipiente
5 como el antígeno liofilizado de Men-B, o en un tercer recipiente (ya sea en forma liofilizada, o usualmente en forma líquida).

Donde se incluye un antígeno de difteria en la composición, se prefiere también incluir el antígeno de
10 tétanos y el antígeno de pertussis. De manera similar, donde se incluye un antígeno de tétanos, se prefiere también incluir antígenos de difteria y pertussis. De manera similar, donde se incluye un antígeno de pertussis también se prefiere incluir antígenos de difteria y tétanos. De esta manera se
15 prefieren combinaciones de DTP.

Si se incluye un sacárido de Hib (típicamente como un conjugado), la porción de sacárido puede ser un polisacárido (por ejemplo, polirribosilrribitol-fosfato (PRP) de longitud completa como se purifica de bacterias), pero
20 también es posible fragmentar el sacárido purificado para producir oligosacáridos (por ejemplo con un peso molecular de ~1 a ~5 kDa), por ejemplo por hidrólisis. La concentración del conjugado de Hib en una vacuna reconstituida usualmente estará en el intervalo de 0.5 µg a 50 µg, por ejemplo de 1-20
25 µg, de 10-15 µg, de 12-16 µg, etc. La cantidad puede ser

000057

aproximadamente 15 g, o aproximadamente 12.5 µg en algunas modalidades. Una masa de menos de 5 µg puede ser adecuada [123], por ejemplo, en el intervalo de 1-5 µg, 2-4 µg, o aproximadamente 2.5 µg. Como se describe anteriormente, en 5 combinaciones que incluyen sacárido de Hib y sacáridos meningocócicos, la dosis de lo anterior se pueden seleccionar en base a la dosis del último (en particular, con múltiples serogrupos meningocócicos, su masa promedio). Las características adicionales de los conjugados de Hib son como 10 se describen anteriormente para conjugados meningocócicos, incluyendo la elección de la proteína portador (por ejemplo, CRM197 o toxoide de tétanos), enlaces, relaciones, etc.

Si se incluye un antígeno de *S.pneumoniae*, éste puede ser un polipéptido o un sacárido. Los sacáridos 15 capsulares conjugados son particularmente útiles para inmunizar contra pneumococo. El sacárido puede ser un polisacárido que tiene el tamaño que aumenta con la purificación del sacárido de la bacteria, o puede ser un oligosacárido logrado por fragmentación de este polisacárido. 20 En el producto 7-valente PREVNAR^{MR16}, por ejemplo, se presentan 6 de los sacáridos como polisacáridos intactos en tanto que

¹⁶ Prevnam: Vacuna multivalente conjugado de Pneumococcal (proteína Diphtheria CRM197).

Fluad: Novartis' Influenza Vaccine, Surface Antigen, inactivated, Adjuvanted with MF59C.1.

uno (el serotipo 18C) se presenta como un oligosacárido. Una
 composición puede incluir un sacárido capsular de uno o más de
 los siguientes serotipos pneumocóccicos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A,
 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F,
 5 20, 22F, 23F y/o 33F. una composición puede incluir múltiples
 serotipos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,
 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó más serotipos.
 En la técnica se conocen ya las combinaciones de conjugados 7-
 valente, 9-valente, 10-valente, 11-valente y 13-valente,
 10 puesto que es una combinación no conjugada 23-valente. Por
 ejemplo, una combinación 10-valente puede incluir sacáridos de
 los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una
 combinación 11-valente puede incluir además sacáridos del
 serotipo 3. Una combinación 12-valente puede adicionarse a la
 15 mezcla 10-valente; serotipos 6A y 19A; 6A y 22F; 19A y 22F; 6A
 y 15B; 19A y 15B; r 22F Y 15B; una combinación 13-valente
 puede adicionarse a la mezcla 11-valente; serotipos 19A y 22F;
 8 y 12F; 8 y 15B; 8 y 19A; 8 y 22F; 12F y 15B; 12F y 19A; 12F
 y 22F; 15B y 19A; 15B y 22F, etc. Las características
 20 adicionales de los conjugados pneumocóccicos son como se
 describe anteriormente para conjugados meningocócicos,
 incluyendo elección de la proteína portadora (por ejemplo,
 CRM197 o toxoide de tétanos), enlaces, relaciones, etc. Donde
 una composición incluye más de un conjugado, cada conjugado
 25 puede usar la misma proteína portadora o una diferente

000058

proteína portadora. La referencia 124 describe ventajas potenciales cuando se usan diferentes proteínas portadoras en vacunas multivalentes de conjugados pneumocóccicos.

General

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

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

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

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra dos trazas analíticas sobrepuestas para una composición de la invención. Las líneas son una pre-liofilización y una composición de post-reconstitución. Esencialmente sólo es visible una línea
20 debido a que son cercanamente similares.

La Figura 2 muestra dos trazas analíticas sobrepuestas para una composición almacenada a 4°C y una composición almacenada a 37°C . Diferente de la Figura 1, son
25 visibles las dos líneas.

000060

La Figura 3 muestra el análisis por SDS-paga de varias formulaciones. Las 10 sendas, de izquierda a derecha, muestran: (1) marcador de peso molecular; (2)-(4) antígenos líquidos a 100 µg/ml, 50 µg/ ml y 25 µg/ml; (5) antígenos en
 5 mezcla de 2 % de manitol y 3 % de sacarosa, antes de liofilización; (6) como senda (5), pero después de la liofilización y reconstitución con wfi; (7) como senda (5), pero después de la liofilización y reconstitución con MF59; (8) a (10) como sendas (5) a (7), pero en 5 % de sacarosa.

10

Descripción Detallada de la Invención

Inclusión de Adyuvante en Vacuna de Men-B

La valoración inicial pre-clínica de la vacuna de Men-B de Novartis indicó que una respuesta inmunitaria óptima requirió la presencia de adyuvante de hidróxido de aluminio.
 15 Aún en la presencia de este adyuvante, sin embargo, fue incompleta la cobertura de la cepa. Por ejemplo, en tanto que 100 % de las cepas ST32 y ST8 probadas se aniquilaron por los sueros producidos por la vacuna, esta cifra cayó a 65 % para las cepas ST11. En contraste, el uso de la formulación MF59
 20 como el adyuvante proporcionó 100 % de cobertura para todas las cepas ST32, ST8 y ST11. Los experimentos adicionales confirmaron la superioridad de MF59.

Se vio la misma superioridad cuando se adicionaron sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos A, C, W135 e
 25 Y a la vacuna de Men-B. La inmunogenicidad lograda por esta

000061

vacuna de A-B-C-W-Y fue mejor usando MF59 que cuando se usa hidróxido de aluminio, tanto en términos de títulos bactericidas como de cobertura de cepa.

De esta manera, MF59 proporciona una eficiencia
5 inmunogénica mejorada en comparación al adyuvante de hidróxido de aluminio. Cuando se probó la estabilidad de esto, sin embargo, se encontró que los antígenos de Men-B empezaron a degradarse después de aproximadamente 12 semanas aún cuando se almacenaron a 4°C. Cuando se almacenaron a temperaturas
10 superiores, entonces fue evidente la degradación tan sólo después de 2 semanas, con degradación completa después de 6 meses. El análisis usando el Bioanalizador Agilent 2100 o la cromatografía de exclusión de tamaño confirmó la degradación. En contraste, los antígenos permanecieron estables cuando se
15 adsorbieron a hidróxido de aluminio.

También se vio estabilidad reducida para sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos no de B en MF59. El nivel de ácido siálico libre (un componente en los sacáridos capsulares de Men-C, Men-W135 y Men-Y) aumentó gradualmente en
20 una formulación con adyuvante MF59 almacenada a 4°C, que alcanza aproximadamente 15 % después de 6 meses. A temperaturas superiores, sin embargo, el nivel libre alcanzó 50 % después de aproximadamente 10 semanas y 100 % (es decir, degradación total) en 6 meses.

25 De esta manera, la inmunogenicidad mejorada lograda

000062

por MF59 es a costa de la estabilidad de almacenamiento. Se realizó trabajo para ver si se puede lograr una formulación estable en tanto que se usa MF59 y/o sin que requiera adsorción a un adyuvante de hidróxido de aluminio.

5 Liofilización de Men-B

En un intento para lograr el objetivo de estabilidad, se liofilizaron antígenos de Men-B. Después de la reconstitución, se confirmó que se retuvo su eficiencia. Además, se vio estabilidad para mezclas de antígenos de Men-B
10 con sacáridos capsulares conjugadas de cada serogrupo A, C, W135 e Y.

Por ejemplo, la Figura 1 muestra dos trazos analíticos sobrepuestos, con los picos que corresponden a las posiciones de elusión de las proteínas de Men-B. Los trazos
15 son casi idénticos, no revelando cambios fisicoquímicos sustanciales. En contraste, la Figura 2 muestra dos trazos sobrepuestos de la misma composición almacenada ya sea a 4°C o 37°C, y los cambios son fácilmente visibles. Otras técnicas analíticas confirmaron la ausencia de cualquier cambio
20 detectable pre- y post-liofilización. La integridad de los antígenos individuales de Men-B pareció conservarse aún después de 6 meses de almacenamiento post-liofilización a 4°C.

Las composiciones se han liofilizado en la presencia de 4.5 % de manitol y 1.5 % de sacarosa.

25 De esta manera, se puede lograr estabilidad a largo

000063

plazo de los antígenos meningocócicos sin necesidad de adsorción a una sal de aluminio. De esta manera, la liofilización permite que los antígenos se usen en combinación con una emulsión de aceite en agua, proporcionando de este modo la eficiencia mejorada y cobertura de cepa que se ha demostrado para estos adyuvantes en tanto que se evitan los problemas asociados de estabilidad.

Formulaciones Adicionales

En un trabajo adicional de desarrollo para una presentación liofilizada de la vacuna de Men-B, se prepararon dos formulaciones de la vacuna de proteína recombinante. Ambas usaron sacarosa como un estabilizador de liofilización, pero una incluyó adicionalmente manitol. La osmolaridad es 300mOsmU y en pH es 7.0. Cada frasco incluye suficiente material para una dosis humana con un exceso de 40 % (70 µg de cada proteína recombinante, 15 mg de PBS, y ya sea 14 mg de manitol o 21 mg de manitol + 35 mg de sacarosa), y se reconstituirá con 700 µl de agua de MF59 (o por comparación, con wfi).

Se midieron los niveles de humedad inmediatamente después de la liofilización y luego durante un mes a temperaturas bajas o elevadas. El contenido de humedad permaneció constante a aproximadamente 1.1 %.

Una comparación de los trazos de RP-HPLC antes de la liofilización y después de la reconstitución mostró que las

000064

proteínas en ambas formulaciones permanecen estables después de la liofilización aún durante un mes a 37°C. El SDS-PAGE (Figura 3) y las transferencias western también mostraron que las tres proteínas fueron estables después del proceso de liofilización, sin evidencia de degradación ni agregación después de la reconstitución con ya sea MF59 o wfi tanto a 4°C como a 37°C. El análisis Experion dio el mismo resultado. La cromatografía de exclusión de tamaño mostró que la liofilización provocó un pequeño incremento en la agregación, pero la cantidad de agregado no incrementa posteriormente, aún después de 3 meses a 37°C o 6 meses a 4°C.

Estudios de Inmunogenicidad

Se usaron ratones en un estudio de inmunogenicidad para valorar el efecto de la liofilización en la potencia de la vacuna. Se reconstituyeron formulaciones liofilizadas con MF59 y se compararon los títulos contra los mismos antígenos en forma líquida y se mezclaron extemporáneamente con MF59 (como en el planteamiento de "dos frascos"). Las formulaciones indujeron títulos similares.

Para estudiar la estabilidad largo plazo, se almacenaron dos preparaciones liofilizadas de antígeno (una liofilizada con sacarosa, la otra con sacarosa+manitol) a 4°C y se probaron sus inmunogenicidades después de 3 y 6 meses de almacenamiento. Los antígenos almacenados se reconstituyeron con MF59 (también almacenado a 4°C con los antígenos) y se

000065

usaron rápidamente para inmunización. Por comparación, también se mezclaron y probaron en paralelo antígenos acuosos recién preparados y MF59.

Los resultados de ELISA de los dos estudios separados indicaron que las formulaciones liofilizadas, cuando se reconstituyeron con MF59, indujeron títulos similares de anticuerpo (GMT) a aquellos producidos por la formulación recién preparada. Lo mismo se vio cuando se valoraron las respuesta de anticuerpo por SBA, por ejemplo, un titulo de SBA de 32768 se vio en el tiempo cero con el antígeno liofilizado con sacarosa y aún se vio después de 6 meses de almacenamiento. De esta manera, los antígenos de Men-B permanecen activos después de la liofilización y almacenamiento.

En estudios adicionales, se almacenaron preparaciones liofilizadas ya sea a 4°C o 37°C y entonces se valoró la inmunogenicidad. Aún después de 1 mes de almacenamiento a 37°C, los antígenos liofilizados no mostraron pérdida en la actividad de SBA.

Estabilidad de Tamaño de la Emulsión Mezclada con Antígenos Liofilizados de Men-B

El tamaño de gota de aceite de una emulsión MF59 se midió durante un periodo de 24 horas a 4°C y 25°C, ya sea como emulsión sola, o mezclada con antígenos liofilizados de Men-B, o mezclada con un antígeno de control. Los tamaños de gota (nm) fueron como sigue:

Temperatura (°C)	25				4	
Tiempo (horas):	0	3	5	24	0	24
MF59 solo	171	169	172	168	172	170

MF59 + Ag de control	173	170	167	172	169	172
MF59 + Men-Blyo	169	168	176	170	173	171

De esta manera, el tamaño de partícula de la emulsión en la presencia de los antígenos liofilizados de Men-
5 B es estable durante 24 horas a 4°C o 25°C y es esencialmente la misma como la emulsión en sí misma.

Se entenderá que la invención se ha descrito a manera de ejemplo únicamente y se pueden hacer modificaciones en tanto que permanezcan dentro del alcance y espíritu de la
10 invención.

Referencias

- [1] Giuliani et al, (2006) Proc Natl Acad Sci U S A
103(29):10834-9.
- [2] Boutriau et al, (2007) Clin Vaccin Immunol
15 14:65-73.
- [3] WO99/61053.
- [4] WO00/50075.
- [5] WO2006/100109.
- [6] Shi & Schofield (2004) Exp Opin Drug Safety
20 3:153-8.
- [7] Belshe et al, (1998) AIDS. 12(18):2407-15.
- [8] Arigita et al, (2004) Vaccine 22:629-42.
- [9] Granoff et al, (1997) Infect Immun 65:1710.5.
- [10] WO02/09643.
- [11] Katial et al, (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
25

- [12] Patente de los Estados Unidos número 6,180,111.
- [13] WO01/34642
- [14] WO2004/019977.
- [15] Patente Europea 0011243.
- 5 [16] Fredriksen et al, (1991) NIPH Ann. 14(2):67-80.
- [17] WO01/91788.
- [18] WO2005/004908.
- [19] Maiden et al, (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- [20] WO98/56901.
- 10 [21] WO2006/081259.
- [22] Claassen et al, (1996) 14(10):1001-8.
- [23] WO99/10497.
- [24] Steeghs et al, (2001) The EMBO Journal 20:6937-
6945.
- 15 [25] WO00/25811.
- [26] WO01/09350.
- [27] WO02/09746.
- [28] WO02/062378.
- [29] WO2004/014417.
- 20 [30] WO03/105890.
- [31] WO2006/026946.
- [32] WO99/24578.
- [33] WO99/36544.
- [34] WO99/57280.
- 25 [35] WO00/22430.

- [36] WO96/29412.
- [37] WO01/64920.
- [38] WO03/020756.
- [39] WO2004/048404.
- 5 [40] WO2004/032958.
- [41] WO98/53851.
- [42] US-6531131.
- [43] WO00/26384.
- [44] US-6645503.
- 10 [45] WO01/52885.
- [46] Costantino et al, (1992) Vaccine 10:691-8.
- [47] Lieberman et al, (1996) JAMA 275:1499-503.
- [48] WO02/058737.
- [49] WO03/007985.
- 15 [50] Rennels et al, (2002) Pediatr Infect Dis J
21:978-979.
- [51] Campbell et al, (2002) J Infect Dis 186:1848-
1851.
- [52] WO03/080678.
- 20 [53] Glode et al, (1979) J Infect Dis 139:52-56.
- [54] WO94/05325; patente de los Estados Unidos
número 5,425,946.
- [55] Arakere & Frasch (1991) Infect. Immun. 59:4349-
4356.
- 25 [56] Michon et al, (2002) Dev. Biol. 103:151-160.

- 4362.
- [57] Rubinstein & Stein (1998) J. Immunol. 141:4357-
- [58] WO2005/033148.
- [59] WO2007/000314.
- 5 [60] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
- [61] EP-A-0372501.
- [62] EP-A-0378881.
- [63] EP-A-0427347.
- [64] WO93/17712.
- 10 [65] WO94/03208.
- [66] WO98/58668.
- [67] EP-A-0471177.
- [68] WO91/01146
- [69] Falugi et al, (2001) Eur J Immunol 31:3816-
- 15 3824.
- [70] Baraldo et al, (2004) Infect Human 72(8):4884-
- 7.
- [71] EP-A-0594610.
- [72] Ruan et al, (1990) J Immunol 145:3379-3384.
- 20 [73] WO00/56360.
- [74] Kuo et al, (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [75] Michon et al, (1998) Vaccine. 16:1732-41.
- [76] WO02/091998.
- [77] WO01/72337.
- 25 [78] WO00/61761.

000070

- [79] WO00/33882.
- [80] WO99/42130.
- [81] WO2007/000341.
- [82] Bardotti et al, (2008) Vaccine 26:2284-96.
- 5 [83] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919.
- [84] EP-A-0208375.
- [85] Bethell G.S. et al., J. Biol. Chem., 1979, 254,
2572-4.
- [86] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-
10 18.
- [87] WO00/10599.
- [88] Gever et al., Med. Microbiol. Immunol, 165:171-
288 (1979).
- [89] Patente de los Estados Unidos número 4,057,684.
- 15 [90] Patentes de los Estados Unidos números
4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [91] Patente de los Estados Unidos número 4,459,286.
- [92] Patente de los Estados Unidos número 5,204,098.
- [93] Patente de los Estados Unidos número 4,965,338.
- 20 [94] Patente de los Estados Unidos número 4,663,160.
- [95] WO2007/000343.
- [96] WO2007/000342.
- [97] WO2007/000322.
- [98] WO90/14837.
- 25 [99] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines

2:197-203.

[100] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.

[101] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant
Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-
5 44867-X).

[102] Vaccine Adjuvants: preparation Methods and
Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine
series). ISBN: 1-59259-083-7, Ed. O'Hagan.

[103] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.

10 [104] Hariharan et al, (1995) Cancer Res 55:3486-9.

[105] US-2007/014805.

[106] WO95/11700.

[107] Patente de los Estados Unidos número
6,080,725.

15 [108] WO2006/113373.

[109] WO2005/097181.

[110] GB-A-2220211.

[111] US-5472706.

[112] WO2006/110603.

20 [113] Gennaro (2000) Remington: The Science and
Practice of Pharmacy: 20th edition, ISBN: 0683306472.

[114] RIVM report 124001 004.

[115] RIVM report 000012 003.

[116] Bakke et al, (2001) Infect. Immun. 69:5010-
25 5015.

000072

[117] WO01/30390.

[118] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>

[119] Tettelin et al, (2000) Science 287:1809-1815.

[120] Pettersson et al, (1994) Microb Pathog
5 17(6):395-408.

[121] Welsch et al, (2002) Thirteenth International
Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public
Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Genome-derived antigen
(GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and
10 C Neisseria meningitidis strains.

[122] Santos et al, (2002) Thirteenth International
Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public
Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Serum bactericidal
responses in Rhesus macaques immunized with novel vaccines
15 containing recombinant proteins derived from the genome of N.
meningitidis.

[123] WO2007/000327.

[124] WO2007/071707.

20

25

000073

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende:

- 5 (i) un primer recipiente que contiene un adyuvante que comprende una emulsión de aceite-en-agua, y
- (ii) un segundo recipiente que contiene una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno.

10 2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la composición antigénica liofilizada en el segundo recipiente comprende además un sacárido capsular conjugado de uno o más de N. meningitidis serogrupos A, C, W135 y Y.

3. El kit de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la composición antigénica liofilizada está libre de sales de aluminio.

15

4. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la composición antigénica liofilizada y el adyuvante de emulsión están libres de sales de aluminio.

20 5. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la composición antigénica liofilizada comprende vesículas de la membrana a partir de una cepa del serogrupo B de N. meningitidis.

000074

6. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición antigénica liofilizada comprende proteínas recombinantes de una cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*.
- 5 7. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedente, caracterizado porque la composición antigénica liofilizada comprende una lipooligosacárido de una cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*.

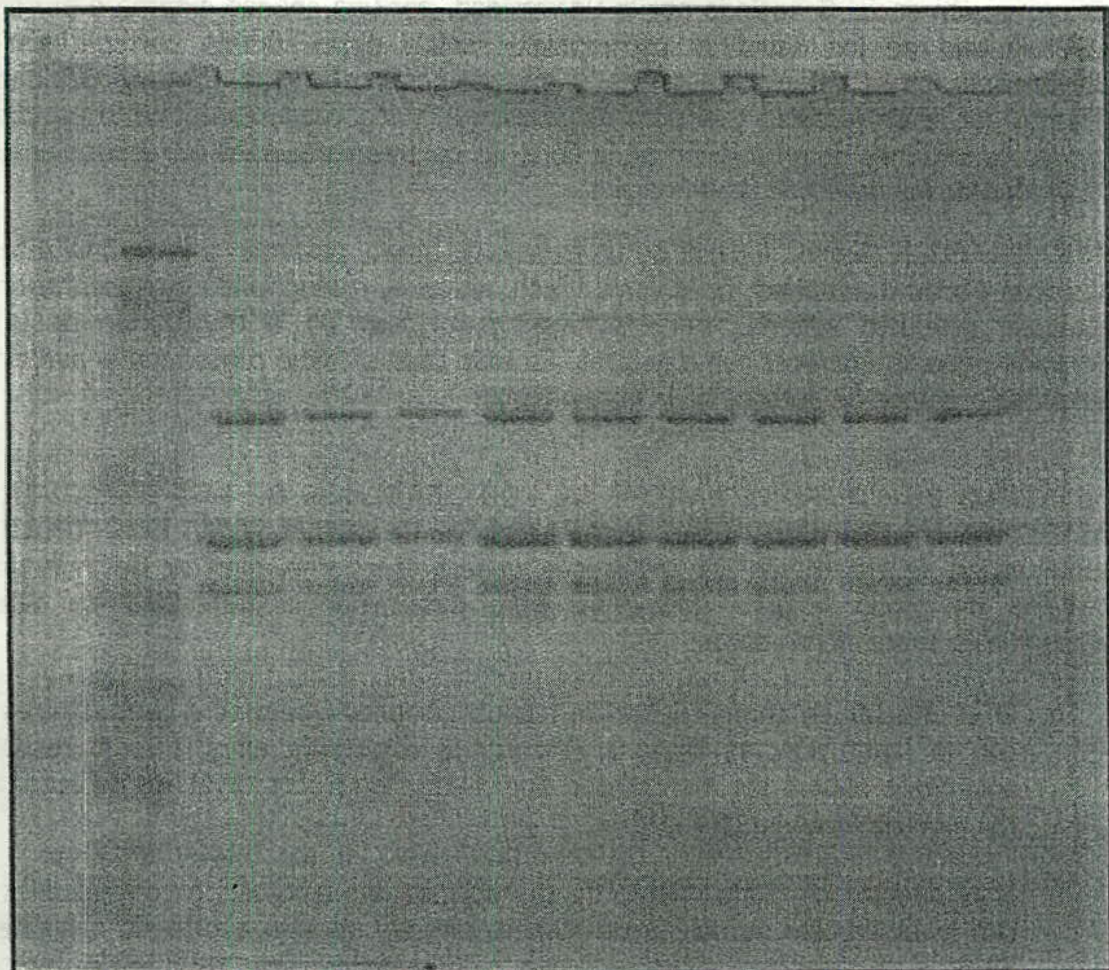


FIG. 3

000076