

JOSE LLOREDA C/
ABOGAT
Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-007266-A-00006-0000

Fecha: 2011-04-04 17:24:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 205

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-007266-A-00006-0000

Fecha: 2011-04-04 17:24:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 188

Re: PI.-GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.-Solicitud de Patente de
Invención en Fase Nacional PCT para "COMPOSICIONES DE VACUNA DE
NEISSERIAL QUE COMPRENEN UNA COMBINACIÓN DE ANTÍGENOS".-
Clase A61K 39/095.-Expediente número 05-007.266A-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 26 de Noviembre de 2010 y a mi memorial de plazo de 16 de Febrero de 2011.

2. Con el fin de responder las objeciones presentadas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico No. **4084** en relación con la Claridad del Capítulo reivindicatorio y la Novedad de la solicitud en estudio, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

3. **SOLICITUD DIVISIONAL**

En primera instancia, y antes de entrar a discutir los ya mencionados argumentos técnicos y modificaciones que permiten superar las objeciones anteriormente referenciadas, me permito manifestar a ese Despacho que con el fin de brindar mayor claridad al objeto de la invención, es deseo del solicitante presentar una solicitud divisional dirigida específicamente a composiciones inmunogénicas que contienen antígenos de proteína autotransportadora seleccionados únicamente entre dos posibilidades, en combinación con al menos otro antígeno seleccionado de una adhesina neisserial, una toxina neisserial, una proteína neisserial de adquisición de hierro y una proteína neisserial asociada a la membrana, seleccionados cada uno de estos de un número limitado de posibles antígenos. Consecuentemente, la solicitud original se dirige a una composición inmunogénica que comprende de manera particular realizaciones preferidas de la presente invención.

Por lo tanto, debidamente autorizado por el solicitante, y de conformidad con el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, el Artículo 7 del Decreto 2591 de 13 de Diciembre de 2000 y el Artículo 11 de la Resolución No. 00210 de 15 de Enero de 2001, se ha dividido la presente solicitud de patente en dos (2) solicitudes, a saber:

- (1) Una solicitud **original** compuesta por **46** reivindicaciones que encuentran su sustento en la descripción y en el capítulo reivindicatorio originalmente presentado a ese Despacho con la presente solicitud número **05-007.266A**, y que corresponden específicamente a las reivindicaciones **1 a 18, 20 a 40, 48 a 52, 55 y 56** que actualmente se encuentran bajo estudio, sobre las cuales se han hecho modificaciones con el fin de superar las objeciones de claridad de la solicitud hechas por el Señor Examinador, tal como se expondrá más adelante en este mismo memorial.

De esta manera, el capítulo reivindicatorio de la solicitud número **05-007.266A** original, se encuentra ahora dirigido a proteger únicamente **las composiciones inmunogénicas que contienen como antígeno de proteína autotransportadora NadA**, en combinación con otro antígeno, seleccionado de un grupo particular de proteínas.

- (2) Una solicitud **fraccionada** número **05-007.266B** que presenta un nuevo capítulo reivindicatorio constituido por **48** reivindicaciones que encuentran su sustento tanto en la descripción como en el capítulo reivindicatorio originalmente presentados, y que corresponden a otra realización de la materia objeto de la solicitud actualmente presentada ante ese Despacho para la solicitud original número **05-007.266A**, la cual es ilustrada en particular en el **Ejemplo 20** de la página 143 de la descripción. Dichas reivindicaciones han sido modificadas de manera que se excluye completamente la materia contenida dentro de la solicitud original.

Consecuentemente, la nueva solicitud fraccionada número **05-007.266B** se encuentra dirigida a proteger las composiciones inmunogénicas que comprenden como antígeno de autotransportadora Neisserial **Hsf o Hap**, en combinación con otro tipo diferente de antígeno.

En relación con lo anterior, me permito señalar que los capítulos reivindicatorios, tanto de la solicitud original como de la solicitud divisional, cuentan con pleno sustento en la descripción de la solicitud en estudio, y no constituyen de ninguna manera una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada toda vez que estos reclaman realizaciones preferidas de la invención, las cuales se encuentran cobijadas por el alcance del capítulo reivindicatorio actualmente presentado ante ese Despacho.

4. Acompaño los documentos que detallo a continuación, relacionados con cada una de las solicitudes resultantes del presente fraccionamiento:

- (1) **SOLICITUD No. 05-007.266A: "COMPOSICIONES DE VACUNA NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA COMBINACIÓN DE ANTÍGENOS"**

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

(a) Nuevo capítulo reivindicatorio modificado compuesto ahora por **46** reivindicaciones, cuyo sustento se encuentra adicionalmente en la descripción de la solicitud número **05-007.266A** inicialmente radicada el 23 de Abril de 2010; y

(b) Copia del documento: *Giuliani, et al, PNAS, vol. 103, no. 29, July 18, 2006*, el cual será discutido más adelante en el presente memorial.

(2) **SOLICITUD DIVISIONAL B: "COMPOSICIONES DE VACUNA NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA COMBINACIÓN DE ANTÍGENOS"**.

(a) Recibo número 11-0021246, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de los derechos que causa el presente fraccionamiento;

(b) Resumen, Objeto y finalidad de la invención y páginas 2 a 146 del texto de la descripción que corresponden al originalmente presentado en la solicitud número **05-007.266A**;

(c) Páginas 147 a 159 del nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por **48** reivindicaciones, las cuales encuentran pleno sustento en la descripción y en el capítulo reivindicatorio presentado con la solicitud número **05-007.266A** inicialmente radicada;

(d) Copia figuras 1-11;

(e) Extracto de la solicitud, en sus dos formas, que incluye el título que se encuentra de acuerdo con el objeto de la presente invención fraccionada y que incluye la reivindicación 1;

(f) Tarjeta de propietario;

(g) Fotocopia del documento que acredita a la suscrita ALICIA LLOREDA y/o al doctor GUSTAVO TAMAYO, y/o a la doctor IGNACIO SANTAMARIA y/o a al doctor ENRIQUE ALVAREZ, en los términos del Párrafo 1º del Artículo 543 del Decreto-Ley 410 de 1971, como Representantes Legales en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, organizada y existente de conformidad con las leyes del Bélgica y domiciliada en Rixensart, Bélgica;

(h) Fotocopia del documento que acredita el traspaso que los autores del invento de la referencia, hacen a favor de mí representado de sus derechos sobre el mismo junto con la Traducción Oficial 091/05;

(i) Formato Único de Conversión, División y Fusión de Solicitudes número 2000-14.

5. **CLARIDAD DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

Ahora bien, dentro del mencionado Concepto Técnico No. **4084** el Señor Examinador objeta la claridad del capítulo reivindicatorio actualmente presentado, señalando que este se dirigiría a un número demasiado alto de posibles composiciones que excederían lo realmente desarrollado por el solicitante y lo que se ha comprobado que tiene la acción terapéutica señalada.

Sobre este particular me permito manifestar que con el propósito de definir más claramente el alcance de la invención, se presenta adjunto a este memorial un capítulo reivindicatorio modificado el cual está dirigido a una realización preferida de la invención, de acuerdo con lo expuesto a lo largo del texto de la descripción de la solicitud en estudio.

En conexión con lo anterior me permito reiterar que estas modificaciones no constituyen de ninguna manera una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está limitando de forma significativa el número de posibles composiciones inmunogénicas reclamadas en concordancia con lo señalado dentro del texto de la descripción, tal como se discute a continuación.

- **Reivindicación 1.** Se ha restringido el antígeno de autotransportadora Neisserial únicamente a **NadA**, y cada uno de los posibles antígenos adicionales se han limitado únicamente a las posibilidades preferidas de la invención. De esta forma, la nueva reivindicación 1 se lee como sigue:

"Una composición inmunogénica que comprende un antígeno de autotransportador Neisserial el cual es NadA y al menos un antígeno diferente, el cual se selecciona de las siguientes categorías:

- a) por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, Hsf y Hap;*
- b) por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FrpC y FrpA/C;*
- c) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28, y NMB0964; o*

d) por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, y GNA1870;

y en donde los antígenos, cuando están presentes en una vesícula de membrana exterior, han sido regulados en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior."

En relación con esta restricción me permito señalar que el solicitante ha comprobado la actividad biológica de las composiciones que comprenden específicamente estos antígenos. Como prueba de ello me permito presentar el documento: **Giuliani, et al, PNAS, vol. 103, no. 29, July 18, 2006**, el cual muestra una vacuna que comprende como antígenos NadA, GNA1870 y GNA2132 (Lipo28), que se encuentra cobijada bajo el alcance del nuevo capítulo reivindicatorio.

En la página 10835 del mencionado documento (primera columna) los autores señalan que "La potencia de la vacuna multicomponente fue también demostrada por teñido InmunoGold de la superficie bacterial empleando los tres antígenos de vacuna que elicitan los mejores títulos BCA (Tabla 1). Los anticuerpos contra GNA2132, GNA1870 y NadA tiñeron la superficie de la cepa BZ83 MenB con distinta intensidad (Fig 2 a.c). Sin embargo, el teñido llevado a cabo con antisuero producido contra la vacuna (Fig 2d) incrementó grandemente la densidad de las partículas de oro a un nivel que fue comparable con aquel obtenido empleando anticuerpos contra MC58 PorA (Fig. 2e), el cual se conoce que confiere protección en humanos". Así mismo, la página 1038, primera columna de este documento señala que "Si los resultados reportados aquí se confirman en ensayos clínicos, esta vacuna probablemente conquistará una de las enfermedades más devastadoras que todavía causa alta morbilidad y mortalidad en niños y adolescentes". De esta forma, la composición inmunogénica que comprende los antígenos específicos a los que se refiere el capítulo reivindicatorio modificado trabajan juntos para alcanzar un resultado mejorado, lo que demuestra que dichas composiciones inmunogénicas que son ahora reclamadas poseen la actividad terapéutica señalada.

En este sentido me permito resaltar que los datos contenidos en el mencionado documento demuestran la efectividad de las composiciones que se encuentran reveladas de forma particular en la descripción de la presente solicitud, como se señala en la página 74 de dicha descripción.

- **Reivindicaciones 2 a 18.** Estas reivindicaciones se han modificado de acuerdo con las restricciones realizadas en la reivindicación 1, de manera que se hace referencia únicamente a ciertos antígenos particulares.

- **Reivindicación 19.** Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 20 a 40 (nuevas reivindicaciones 19 a 39).** En donde ha sido necesario se han ajustado estas reivindicaciones a las modificaciones realizadas dentro de la reivindicación 1. Así mismo, se ha hecho que su dependencia sea congruente con la nueva numeración.
- **Reivindicaciones 41 a 47.** Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 48 a 52 (nuevas reivindicaciones 40 a 44).** Se han limitado los antígenos referenciados en estas reivindicaciones en concordancia con la reivindicación 1 modificada.
- **Reivindicación 54.** Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 55 y 56 (nuevas reivindicaciones 45 y 46).** Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas.

Como consecuencia de lo anterior, el capítulo reivindicatorio modificado queda constituido por **46** reivindicaciones, las cuales reclaman de manera clara y concisa realizaciones preferidas de la invención, que cuentan con pleno sustento en la descripción y cuya actividad biológica ha sido comprobada.

Por otro lado, dentro de su ya referenciado Concepto Técnico No. **4084** el Señor Examinador señala que las reivindicaciones 4 a 7, 23 a 27 (nuevas 22 a 26) y 55 a 56 (nuevas 45 y 46) no estarían correctamente definidas, toda vez que no hacen referencia a características técnicas estructurales.

A este respecto me permito señalar que la persona versada en la materia, a la cual va dirigida la presente solicitud, encontraría claras las mencionadas reivindicaciones, toda vez que tal como han sido redactadas permiten distinguir sin lugar a dudas el alcance de la reclamación.

De esta forma, la reivindicación 4 se refiere a preparaciones de membrana externa en las cuales algunos antígenos particulares, específicamente aquellos referenciados en la reivindicación 1, se encuentran regulados a niveles mayores de expresión. Para la persona versada en la materia sería claro que como parte del proceso infeccioso, bacterias gram-negativas como las del género *Neisseria* producen vesículas con su membrana externa, y

que la regulación a mayores niveles de expresión de los antígenos señalados en la reivindicación 1 hacen que estas vesículas puedan ser empleadas en una composición inmunogénica que comprenda en mayor cantidad dichos antígenos y por lo tanto brinde el efecto mejorado descrito por la presente solicitud.

De manera similar, las reivindicaciones 6 y 7 se refiere a composiciones de subunidad, es decir, composiciones que incluyen fragmentos de los antígenos y no los antígenos de cadena completa.

Por su parte, las reivindicaciones 23 a 27 (nuevas reivindicaciones 22 a 26) definen el tipo particular de célula hospedero a partir de la cual se producen vesículas de membrana externa, definiendo que dicha célula ha sido modificada para regular a niveles más bajos de expresión ciertos genes de función enzimática que disminuyen la toxicidad de las vesículas.

Finalmente, las reivindicaciones 55 y 56 (nuevas reivindicaciones 45 y 46) señalan la manera en la cual se obtiene la regulación a niveles mayores de expresión de ciertas proteínas en las vesículas de membrana externa.

Consecuentemente, las mencionadas reivindicaciones se refieren de manera clara y precisa a características adicionales de la invención, que serían entendidas en su totalidad por la persona versada en la materia, y por lo tanto no es necesaria la introducción de características estructurales adicionales para su correcta interpretación.

En vista de todo lo discutido anteriormente, es evidente que el capítulo reivindicatorio modificado se refiere de manera clara y precisa a realizaciones de la invención que cuentan con pleno sustento en la descripción y cuya actividad biológica ha sido comprobada, por lo que dicho capítulo reivindicatorio modificado cumple a cabalidad con las exigencias estipuladas por el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

6. **NOVEDAD.**

Finalmente, el Señor Examinador objeta la novedad de la solicitud en estudio a la luz de las enseñanzas del documento **WO 01/09350 (D1)**.

En este sentido, el Señor Examinador asegura que D1: *"enseña vacunas que proveen vesículas, las cuales presentan en su misma estructura una composición inmunogénica, donde se encuentran los antígenos reivindicados, tales como Hap y Hsf (pág 31) entre otros"*.

Con respecto a este señalamiento **me permito resaltar que el documento D1 se refiere de forma general a los métodos por los cuales se puede regular la**

expresión de antígenos en bacterias gram-negativas, pero sus enseñanzas no revelan una composición inmunogénica que comprenda específicamente la combinación de los antígenos que incluye aquellas composiciones reclamadas por la presente solicitud.

De esta forma, D1 puede considerarse como un documento del estado del arte que revela métodos de regulación de expresión de genes, tal como se señala a lo largo del texto de la descripción de la solicitud en estudio, donde dicho documento es citado e incorporado en su totalidad como referencia.

En este sentido, la señalada página 31 de D1 se refiere específicamente a la forma de hacer la regulación de la expresión de antígenos particulares, pero de ninguna manera señala las características particulares que posee la presente invención: la combinación de al menos dos antígenos de diferentes categorías.

En este punto es importante resaltar que la descripción de la solicitud (páginas 12 y 13) claramente señala que para obtener una respuesta inmunológica mejorada deben presentarse dentro de la composición inmunogénica al menos dos antígenos de distintas categorías, ya sean aislados o enriquecidos por la expresión aumentada ciertos genes.

Así mismo, la solicitud en estudio muestra también que la presencia de un antígeno en un nivel normal en la superficie de las vesículas no es suficiente para elicitarse una respuesta inmunológica satisfactoria. De esta forma, el ejemplo 16 de la página 135 de la descripción de la solicitud en estudio comprueba que se requiere una regulación a niveles mayores de expresión de los antígenos para producir títulos contra dichos antígenos, y que si dicha expresión a mayores niveles no se lleva a cabo, no se registran títulos de anticuerpos. En este sentido me permito señalar que la persona versada en la materia reconocería que en el campo de la vacunas esta falta de títulos de anticuerpos sería totalmente indeseable, por lo que la solicitud demuestra que se requieren niveles alto de expresión de específicamente ciertas proteínas, en combinación dentro de una composición inmunogénica, para obtener dicho efecto mejorado.

En este sentido, el documento D1 falla en mostrar este tipo de composición, y únicamente se refiere a la posibilidad de regular la expresión de ciertos genes, sin resaltar cual tipo particular de expresión sería deseable.

Es más, dentro de los 20 ejemplos revelados en las páginas 42 a 75 de D1 no se muestra ninguna composición inmunológica que comprenda específicamente dos o más antígenos como son definidos en la reivindicación 1, y mucho menos una composición que comprenda siempre NadA en combinación con al menos otro antígeno seleccionado en particular de FhaB, NspA, Hsf, Hap; FrpC, FrpA/C;

TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28, NMB0964; PilQ, OMP85, y GNA1870, como aquella que es ahora objeto de la presente invención.

Dentro de este contexto, me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a la novedad de una solicitud de patente¹:

"Se aclara, que la novedad no es un requisito que deban cumplir todos y cada uno de los componentes que conforman una invención, pudiendo incluso ser conocidos algunos o todos de tales componentes, si combinados entre ellos dan lugar a un objeto o a un procedimiento desconocido anteriormente ya que toda innovación requiere aplicar conocimientos y objetos previamente creados o descubiertos por la humanidad, los cuales constituirán la 'materia prima' para desarrollar un nuevo producto o procedimiento.

El Tribunal a manera de orientación ha tomado como referencia criterios de las Cámaras de Recursos de la Oficina Europea de Patentes (OEP), según los cuales "la falta de novedad de una invención se configurará si su objeto deriva clara, precisa y directamente del estado de la técnica, y si en éste son conocidas todas las características de aquélla."

En vista de lo anterior, es evidente que dentro de la legislación Andina, para que un documento afecte la novedad de una solicitud de patente, este documento debe hacer una divulgación específica de todas y cada una de las características técnicas de la invención, interactuando particularmente de la manera en la que lo hacen dentro de dicha invención.

Consecuentemente, **dado que el documento D1 no enseña de forma clara y precisa una composición inmunogénica que comprenda NadA combinado con al menos un antígeno seleccionado de FhaB, NspA, Hsf, Hap; FrpC, FrpA/C; TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28, NMB0964; PilQ, OMP85 y GNA1870, dicho documento no puede de ninguna manera anticipar la presente solicitud.**

De esta forma, la solicitud en estudio es a todas luces novedosa frente a las enseñanzas de D1, lo cual es aún más evidente en virtud del capítulo reivindicatorio modificado presentado junto con este memorial, y por lo tanto dicha solicitud cumple a cabalidad con lo estipulado por el Artículo 16 de la Decisión Andina 486 de 2000.

¹ Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 089-IP-2008.

7. **CONCLUSIÓN.**

Para finalizar me permito resaltar que en virtud de las modificaciones realizadas sobre el capítulo reivindicatorio y de la solicitud divisional presentada, el mencionado capítulo reivindicatorio modificado es totalmente claro y conciso al reclamar la composición inmunogénica que es objeto de la presente solicitud.

De otra parte, me permito señalar que los argumentos discutidos establecieron que el documento D1 revela de manera general métodos para regular la expresión de ciertos genes, pero no enseña de forma clara y precisa una composición inmunogénica que posea todas y cada una de las características técnicas contenidas en la presente invención, y por lo tanto, se demostró que la solicitud en estudio es a todas luces novedosa frente al estado del arte más próximo.

8. De otra parte, dado que la fecha de presentación de la solicitud resultante del presente fraccionamiento es la misma --**28 de Enero de 2005**-- atentamente solicito a usted se sirva dar a la solicitud fraccionada el mismo número de Expediente de la solicitud original, acompañada de la letra "**B**" para su identificación. Adicionalmente, la Clasificación Internacional para esta solicitud fraccionada, acorde con el objeto de la misma, es la siguiente: **A61K 39/095**.

9. En cuanto a la reivindicación de la prioridad respecto de la solicitud divisional, es la misma invocada en la solicitud original, la cual fue reivindicada oportunamente en Fase Internacional de las solicitudes número: GB 0218037.0, GB 0218036.2, GB 0218035.4, GB 0218051.1 de Agosto 2 de 2002, GB 0220197.8, GB 0220199.4 de de Agosto 30 de 2002, GB 0225524.8, GB 0225531.3 de Noviembre 1 de 2002, GB 0230164.6, GB 0230168.7, GB 0230170.3 de Diciembre 24 de 2002 y GB 0305028.3 de Marzo 5 de 2003.

10. Ratifico a usted que la sociedad titular de la solicitud fraccionada en cuestión es **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica y domiciliada en Rixensart, Bélgica.

11. Así mismo, reitero a usted que el documento que acredita mi calidad de Representante Legal en dicha sociedad para todos los asuntos de la Propiedad Industrial, fue presentado junto con la solicitud el 28 de Enero de 2005.

12. De conformidad con lo establecido por el Artículo 36 de la Decisión 486 de 2000, solicito a ese Despacho se sirva aceptar y estudiar la solicitud divisional presentada y conceder el privilegio de patente solicitado.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

13. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,

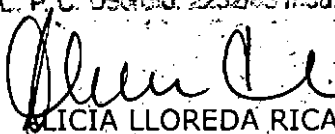

ALICIA LLOREDA RICAURTE

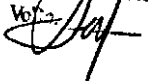
T. P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente Alicia Lloreda Ricaurte identificada (o) con: 39 690 713 y tarjeta profesional de abogado No. 53215 del Consejo Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella (el) mismo en este escrito.

(Art. 1.º C. P. C. Decreto 2232/83 mod. 36)

 14 MAR. 2011
ALICIA LLOREDA RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén

Josely N. Joly
Morales Estrada
C.C. 1.015.932.113
Votó 

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno de autotransportador Neisserial el cual es NadA y al menos un antígeno diferente, el cual
5 se selecciona de las siguientes categorías:
 - a) por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, Hsf y Hap;
 - b) por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FrpC y FrpA/C;
 - 10 c) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28, y NMB0964; o
 - d) por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, y GNA1870;
- 15 y en donde los antígenos, cuando están presentes en una vesícula de membrana exterior, han sido regulados en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.
2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, la cual es
20 una composición de subunidad.
3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el al menos un antígeno diferente es seleccionado de la siguiente lista: FhaB, NspA, el dominio pasajero de Hap, el dominio de superficie expuesta de OMP85, FrpC, LbpB, y
25 Lipo28.
4. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una preparación de vesícula de membrana exterior, en donde los antígenos han sido regulados en forma ascendente (preferiblemente
30 recombinantemente) en la vesícula de membrana exterior.

5. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el al menos un antígeno diferente es seleccionado de la siguiente lista: NspA, Hap, OMP85, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpB, PilQ, y GNA1870,

5 en donde el al menos un antígeno diferente es regulado en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.

6. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una composición de subunidad que tiene uno o más de los antígenos, y una preparación de vesícula de membrana exterior que tiene por lo menos un
10 antígeno, el cual ha sido regulado en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.

7. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una composición de subunidad y una preparación de vesícula de membrana exterior, en donde la composición de subunidad comprende por lo menos
15 uno de los antígenos seleccionados de la siguiente lista: FhaB, NspA, el dominio pasajero de Hsf, el dominio pasajero de Hap, el dominio de superficie expuesta de OMP85, FrpC, LbpB, y Lipo28; y en donde la preparación de la vesícula de membrana exterior que tiene por lo menos un antígeno el cual ha sido regulado en forma
20 ascendente en la vesícula de membrana exterior y comprende al menos un antígeno regulado en forma ascendente seleccionado de la siguiente lista, el cual es diferente de el al menos un antígeno en las composiciones de subunidad: NspA, Hsf, Hap, OMP85, , TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpB, PilQ y GNA1870.

25 8. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-7, que comprende por lo menos dos preparaciones diferentes de vesícula de membrana exterior de la reivindicación 4 o 5.

9. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4-8, en
30 donde además se selecciona NspA.

10. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4-9, en donde además se selecciona Omp85.
11. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4-10, en donde el al menos un antígeno diferente comprende TbpA (alto).
12. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4-11, en donde el al menos un antígeno diferente comprende TbpA (bajo).
- 10 13. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, que además comprende uno o más antígenos adicionales seleccionados de una lista que consiste de Hap, LbpB, y OMP85.
14. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-13 que comprende FhaB; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de Hsf, LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (bajo), TbpA (alto), PilQ, GNA1870, NspA, Lipo28, y NMB0964.
- 15 15. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-14, que comprende NspA; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (bajo), TbpA (alto), PilQ, GNA1870 Lipo28y NMB0964.
16. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-15, que comprende TbpA (bajo); y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (alto), PilQ, GNA1870, y NMB0964.
17. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-16, que comprende TbpA (alto); y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

18. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-17, que comprende OMP85; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: FrpC, FrpA/C, PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

5

19. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-18, que comprende FrpC; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

10

20. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-19, que comprende GNA1870; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: Lipo28, y NMB0964.

15

21. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-20, que comprende Lipo28; y por lo menos un antígeno adicional el cual es NMB0964.

20

22. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-21, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de IgtB o IgtE, preferiblemente el primero.

25

23. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-22, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior es incapaz de sintetizar el polisacárido capsular, y ha sido preferiblemente diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de SiaD, ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, synA (equivalente a synX y SiaA) o synB (equivalente de SiaB) y synC (equivalente de siaC), preferiblemente SiaD.

30

24. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-23, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de

membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de OpC, OpA o PorA, preferiblemente PorA.

25. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-24, en
5 donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de FrpB.

26. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-25, en
10 donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de msbB y/o htrB, preferiblemente msbB.

27. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-26, que
15 comprende un antígeno derivado de *Neisseria meningitidis*, preferiblemente el serogrupo B.

28. Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con las reivindicaciones 1-27,
que comprenden un antígeno derivado de *Neisseria gonorrhoeae*.

20

29. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-28, en
donde todos los antígenos neisserial se derivan de *N. meningitidis*, preferiblemente del serogrupo B.

25 30. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-29, que además comprende uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos.

31. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 30, en donde
los polisacáridos u oligosacáridos capsulares se derivan de bacterias seleccionadas
30 del grupo que consiste de: serogrupo A, C, Y y W-135 de *Neisseria meningitidis*,

Haemophilus influenzae b, *Streptococcus pneumoniae*, Grupo A de *Streptococci*, Grupo B de *Streptococci*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

32. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 30-31, en
5 donde el polisacárido u oligosacárido capsular está conjugado a una proteína.

33. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-32, que comprende un auxiliar.

10 34. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 33, que comprende sales de aluminio, preferiblemente fosfato de aluminio.

35. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 33 o 34, que comprende 3D-MPL.

15

36. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-35, y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 37. Una vacuna que comprende uno o más polinucleótido(s) que codifican al menos una proteína de autotransportadora Neisserial y al menos una proteína diferente cuya expresión se conduce a través de un promotor eucariótico, en donde la proteína de autotransportadora Neisserial es NadA, y la al menos otra proteína diferente se selecciona de las siguientes categorías:

25 a) por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, Hsf y Hap;

b) por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FrpC y FrpA/C;

c) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28, y NMB0964; o

d) por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, y GNA1870.

5 38. Un método para hacer la composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-35, que comprende un paso de mezclar juntos por lo menos dos antígenos de Neisseria.

39. Un método para hacer la vacuna de acuerdo con la reivindicación 36, que
10 comprende el paso de combinar la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-35 con un portador farmacéuticamente aceptable.

40. La composición inmunogénica de la reivindicación 14 que comprende FhaB; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: LbpB,
15 FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (bajo), TbpA (alto), Hap, PilQ, GNA1870, NspA, Lipo28, y NMB0964.

41. La composición inmunogénica de la reivindicación 15 que comprende NspA; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: LbpB,
20 FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (bajo), TbpA (alto), PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

42. La composición inmunogénica de la reivindicación 17 que comprende TbpA (alto); y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: FrpC, FrpA/C, OMP85, PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

25

43. La composición inmunogénica de la reivindicación 18 que comprende; OMP85; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: LbpB, FrpC, FrpA/C, PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

44. La composición inmunogénica de la reivindicación 19 que comprende FrpC; y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.
- 5 45. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los antígenos se han regulado de manera ascendente en la vesícula de membrana exterior a través del crecimiento de una cepa madre de *Neisseria* bajo condiciones limitadas de Hierro.
- 10 46. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde al menos un antígeno regulado de manera ascendente en la vesícula de membrana exterior ha sido regulado de manera ascendente a través del crecimiento de una cepa madre de *Neisseria* bajo condiciones limitadas de Hierro.

A universal vaccine for serogroup B meningococcus

Marzia M. Giuliani*, Jeannette Adu-Bobie*, Maurizio Comanducci*, Beatrice Aricò*, Silvana Savino*, Laura Santini*, Brunella Brunelli*, Stefania Bambini*, Alessia Biolchi*, Barbara Capecci*, Elena Cartocci*, Laura Ciocchi*, Federica Di Marcello*, Francesca Ferlicca*, Barbara Galli*, Enrico Luzzi*, Vega Masignani*, Davide Serruto*, Daniele Veggi*, Mario Contorni*, Maurizio Morandi*, Alessandro Bartalesi*, Vanda Cinotti*, Donatella Mannucci*, Francesca Titta*, Elisa Ovidi†, Jo Anne Welsch‡, Dan Granoff‡, Rino Rappuoli*§, and Mariagrazia Pizza*

*Novartis Vaccines, Via Fiorentina 1, 53100 Siena, Italy; †Centro Interdipartimentale di Microscopia Elettronica, University of Tuscia, 01100 Viterbo, Italy; and ‡Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA 94609

This contribution is part of the special series of Inaugural Articles by members of the National Academy of Sciences elected on May 3, 2005.

Contributed by Rino Rappuoli, May 12, 2006

Meningitis and sepsis caused by serogroup B meningococcus are two severe diseases that still cause significant mortality. To date there is no universal vaccine that prevents these diseases. In this work, five antigens discovered by reverse vaccinology were expressed in a form suitable for large-scale manufacturing and formulated with adjuvants suitable for human use. The vaccine adjuvanted by aluminum hydroxide induced bactericidal antibodies in mice against 78% of a panel of 85 meningococcal strains representative of the global population diversity. The strain coverage could be increased to 90% and above by the addition of CpG oligonucleotides or by using MF59 as adjuvant. The vaccine has the potential to conquer one of the most devastating diseases of childhood.

meningococcus B | reverse vaccinology

Neisseria meningitidis is an encapsulated, Gram-negative bacterium that colonizes the upper respiratory tract of ~10% of humans. With a frequency of one to three cases per 100,000 of the population, the bacterium enters the bloodstream, where it multiplies to high density and causes a form of sepsis characterized by the dramatic disruption of the endothelium and microvasculature. From the bloodstream the bacterium can cross the blood-brain barrier and cause meningitis. The invasive infection is very dramatic, affecting mostly infants, children, and adolescents who do not have bactericidal antibodies to the infecting strain. Within a few hours otherwise healthy subjects become severely sick, and, despite the sophistication of modern medicine and availability of effective antibiotics, 5–15% die, and up to 25% of the survivors have lifelong sequelae. During epidemics the frequency of disease increases to >10/100,000 of the population and rises to as high as 400/100,000. Based on the chemical composition of the polysaccharide capsule, *N. meningitidis* strains can be classified into 13 different serogroups. Strains representative of five serogroups (A, B, C, Y, and W135) cause nearly all disease in humans (1, 2).

Most of the strains isolated from invasive meningococcal disease have also been classified by multilocus enzyme electrophoresis (3) into several hypervirulent lineages (electrophoretic types: ET37, ET5, cluster A4, lineage 3, and subgroups I, III, and IV-1) or by multilocus sequence typing (4) into sequence type (ST) complexes (cpx) ST11, ST32, ST8, ST41/44, ST1, ST5, and ST4.

N. meningitidis causes ~1.2 million cases per year globally, of which 3,000 occur in the United States and 7,000 occur in Europe, where the organism remains the most common cause of bacterial meningitis in children and young adults (5). Serogroup B meningococcus (MenB) is responsible for ~32% of meningococcal disease reported in the United States, and from 45% to >80% of meningococcal disease reported in Europe (6, 7). Immunity against the disease can be acquired naturally or induced by vaccination and correlates with the presence of

bactericidal antibodies, which kill the bacterium in the presence of complement (8). Tetravalent vaccines composed of the purified capsular polysaccharides of serogroups A, C, Y, and W135 have been available for three decades for use in adults. Conjugate vaccines, effective in all age groups, were developed a decade ago (9). Large-scale vaccination against serogroup C meningococcus in the United Kingdom in the year 2000 showed that these vaccines are very safe and effective in eliminating the disease (10) and led to the licensure of tetravalent conjugate vaccines against serotypes A, C, Y, and W-135. Once universally deployed, these vaccines will likely eliminate forever the disease caused by strains with these serogroups.

MenB differs from the others because it is decorated by a capsular polysaccharide identical to the polysialic acid [α (2–8) *N*-acetylneuraminic acid] present in many human glycoproteins. This mimicry rules out the use of polysaccharide–protein conjugate vaccines as an effective strategy to combat MenB disease. Therefore, currently there is no universal vaccine available against this bacterium. Protein-based vaccines composed of outer membrane vesicles (OMV) purified from the bacterium have been produced; however, they induce immunity mostly against the highly variable PorA membrane protein, and efficacy trials have shown serosubtype-specific protection (11). To develop a universal vaccine against MenB, a few years ago we determined the sequence of the genome of the bacterium and used it to discover novel antigens (12, 13). Thus, MenB became the prototype for the use of genomics for vaccine development, a process termed reverse vaccinology (14).

Twenty-eight novel antigens that were able to induce antibodies with bactericidal activity (BCA) in mice when used for immunization using Freund's complete adjuvant (FCA) were identified. Some of the antigens had a high degree of sequence conservation using a historical panel of MenB strains and were recognized by sera of patients convalescent from meningococcal disease (15, 16). Detailed studies on some of the most promising antigens confirmed that some of these antigens were good candidates for a universal vaccine (16, 17), whereas others turned out to be less interesting. For instance, GNA33 was found to be a mimotope of PorA and thus unlikely to be useful as a vaccine because of serosubtype specificity (18).

However, although the *in vitro* antibody data obtained in mice immunized with the individual antigens in FCA were encour-

Conflict of interest statement: All authors either are employed by or have an ongoing collaboration with Novartis Vaccines.

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: ET, electrophoretic type; ST, sequence type; MenB, serogroup B meningococcus; OMV, outer membrane vesicle(s); BCA, bactericidal activity; cpx, complex; FCA, Freund's complete adjuvant.

See accompanying Profile on page 10831.

§To whom correspondence should be addressed. E-mail: rino.rappuoli@chiron.com.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

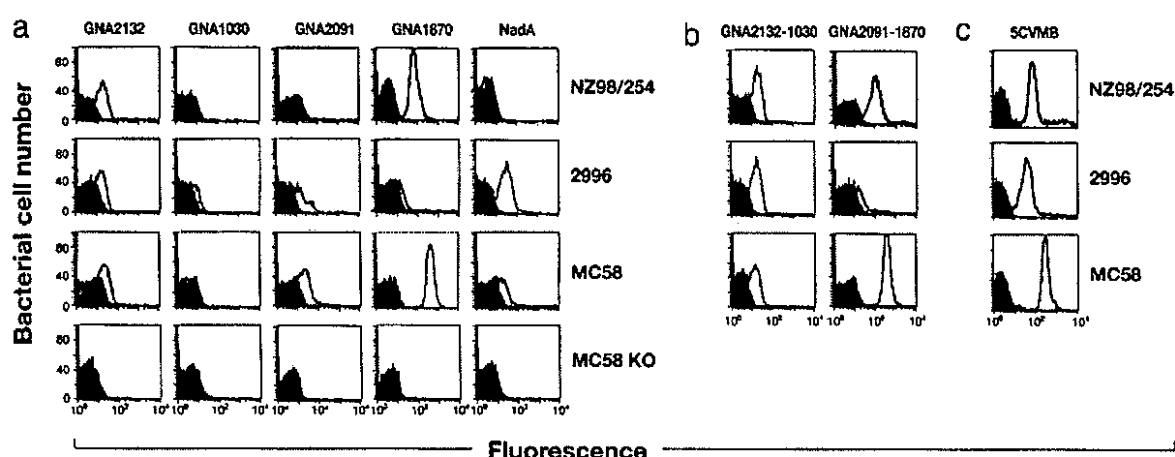


Fig. 1. FACS analysis of *N. meningitidis* strains using sera prepared against vaccine antigens. (a) Binding of polyclonal antiserum raised against the individual antigens GNA2132, GNA1030, GNA2091, GNA1870, and NadA (left to right) to live encapsulated MenB strains NZ98/254 (first row), 2996 (second row), and MC58 (third row). The fourth row contains the MC58 knockout mutants (KO) of each antigen probed with the homologous antiserum. Red profiles represent the negative control (preimmune sera). White profiles show reaction with immune sera. (b and c) Binding of polyclonal antibodies against fusion proteins (b) and 5VCMB vaccine (c). First row, NZ98/254 (B:4:P1.4), ST cpx 41/44, ET lin.3, nadA⁻. Second row, 2996 (B:2b:P1.5.2), ST cpx 8, ET A4. Third row, MC58 (B:15:P1.7, 16b), ST cpx 32, ET ETS.

aging, it was not clear whether the responses were sufficient for the development of a vaccine suitable for human use and able to induce universal protection against recent, genetically diverse, and epidemiologically relevant clinical isolates.

Results

Antigen Selection. The antigens selected by reverse vaccinology were prioritized based on their ability to induce broad protection as inferred by BCA or observed in passive protection in the infant rat or mouse protection assays (19, 20). The three top antigens that met the prioritization criteria were GNA2132 (21), GNA1870 (16, 22, 23), and NadA (17, 24). Two additional antigens, GNA1030 and GNA2091 (13), were selected because they also induced protective immunity but only in some of the assays. FACS analysis (Fig. 1a) showed that the sera obtained from mice immunized with each of the five antigens formulated with aluminum hydroxide stained the surface of one or more of the MenB strains NZ98/254, 2996, and MC58, which were selected as representative of the most common patterns observed among a variety of different strains. The serum against GNA1030, which appears only slightly positive in the figure, showed positive binding to 2996 when the serum used had been obtained by immunizing with complete FCA instead of aluminum (data not shown). The figure also shows that none of the antisera prepared against the individual antigens stained all of the strains well. To confirm the specificity of the analysis, none of the sera stained the MC58 knockout mutants where the corresponding gene had been deleted (Fig. 1a, MC58 KO). Binding activity observed in FACS paralleled antibody functional activity observed in the BCA assay (Table 1). The presence of BCA was tested in sera obtained by immunizing mice with each of the antigens formulated with aluminum hydroxide or FCA (Table 1). With the exception of GNA2091, which, although unable to induce BCA, had been selected for its ability to induce protection in the mouse protection assay (19, 20) (data not shown), each of the other individual antigens induced BCA against one or more of the three strains. The proteins GNA2132, GNA1030, and GNA1870 induced better titers when formulated with FCA than when formulated with aluminum. In the case of NadA, the two adjuvants gave a similar titer.

Although the five antigens had been selected based on their individual behavior, none of them induced protective antibody

responses that were sufficiently broad enough to cover all strains tested.

A Combination of Antigens to Develop an Effective Serogroup B Vaccine. Given that vaccines containing several antigens have been shown to confer better protection than those containing only one or two antigens (25), we combined the five antigens into one multicomponent vaccine, trusting that this would increase the breadth of the vaccine coverage and avoid selection of escape mutants. To facilitate large-scale industrial manufacturing of the vaccine, four of the five antigens were expressed as fusion proteins. Among >30 protein-protein fusions generated, the most promising were the combinations of GNA2132 with GNA1030 and of GNA2091 with GNA1870. NadA did not perform well when fused to other proteins, probably because of the loss of the trimeric organization (data not shown) (24, 26). The two fusion proteins formulated with aluminum hydroxide induced immune responses in both FACS (Fig. 1b) and BCA assays (Table 1) that were generally more potent than those induced by the individual antigens. Twenty micrograms of each of the two fusion proteins and of the NadA antigen was adsorbed to aluminum hydroxide to make the

Table 1. Bactericidal activity of mice polyclonal antibodies

Immunogens	Strains					
	MC58		2996		NZ98/254	
	FCA	Al(OH) ₃	FCA	Al(OH) ₃	FCA	Al(OH) ₃
Antigens						
GNA2132	16,384*	512	16,384	1,024	16,384	512
GNA1030	<4	<4	2,048	<4	<4	8
GNA2091	<4	<4	<4	<4	<4	<4
GNA1870	65,536	16,384	64	<4	16,384	64
NadA	512	1,024	4,096	4,096	<4	<4
Fusions						
GNA2132-1030	n.d.	2,048	n.d.	2,048	n.d.	4,096
GNA2091-1870	n.d.	32,768	n.d.	<4	n.d.	1,024
Vaccine						
5VCMB	65,536	32,768	8,192	4,096	16,384	4,096

*Bactericidal titers were expressed as the reciprocal of the serum dilution yielding ≥50% bactericidal killing. n.d., not determined.

MEDICAL SCIENCES

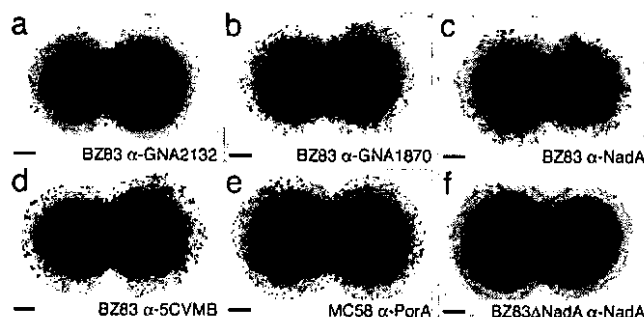


Fig. 2. ImmunoGold labeling and transmission electron microscopy. Analysis of BZ83 strain was performed with antisera raised against vaccine antigens: anti-GNA2132 (a), anti-GNA1870 (b), anti-NadA (c), and anti-5CVMB (d) vaccine. (e) Anti-PorA staining of strain MC58 performed by using a mAb raised against PorA 1.7. (f) Representative control showing anti-NadA staining of strain BZ83 mutant knockout for the *nadA* gene (BZ83ΔNadA). Similar results were obtained when knockout strains in *gna2132* and *gna1870* genes were analyzed with the corresponding antisera (data not shown). (Scale bars: 200 nm.)

vaccine formulation that was used in subsequent studies. We named the multicomponent vaccine 5CVMB (5 component vaccine against MenB). In FACS analysis (Fig. 1c) the antibodies obtained by immunizing with this vaccine stained the three representative MenB strains very well. Similarly, the antibodies had BCA titers against each of the three strains, ranging from 4,096 to 32,768 (Table 1). The respective titers were only slightly lower than those obtained by immunizing with FCA, which is the most potent adjuvant known for mouse immunization but is unsuitable for human use.

The potency of the multicomponent vaccine was also demonstrated by ImmunoGold staining of the bacterial surface using the three vaccine antigens that elicited the best BCA titers (Table 1). The antibodies against GNA2132, GNA1870, and NadA stained the surface of MenB strain BZ83 with different density (Fig. 2a–c). However, the staining performed with antisera raised against the vaccine (Fig. 2d) greatly increased the density of gold particles to a level that was comparable to the one obtained using antibodies against MC58 PorA (Fig. 2e), which is known to confer protection in humans.

Coverage of the MenB Population Diversity. To properly test whether the 5CVMB vaccine formulation was able to induce protection against the majority of the MenB strains, we assembled and characterized a very large collection of clinical isolates representing as closely as possible the global population diversity. In total, 214 *N. meningitidis* strains were collected: 56 from the U.S. and Canada, 44 from the United Kingdom, 98 from other European countries, 2 from New Zealand, 6 from Aus-

tralia, and 8 from other regions of the world. The collection contained mostly recent clinical isolates, although a minority of older laboratory strains were included to bridge the data to those generated in the past with well known strains. Eighty-five of the 214 strains were found to be suitable for BCA assays using several batches of baby rabbit complement. The main properties of the 85 strains are reported (Table 2). Four meningococcal hypervirulent clusters, ST32 cpx or ET5, ST41/44 cpx or lineage 3, ST8 cpx or cluster A4, and ST11 cpx or ET37, represent 56 of 85 (65.9%) of the total strains; 29 of 85 (34.1%) of the strains represent emerging lineages of pathogenic strains that were classified as “others” because they do not belong to any known hypervirulent cluster.

The sera obtained by immunizing mice with the 5CVMB vaccine formulated with aluminum hydroxide were tested in a bactericidal assay against this panel of 85 strains. We found that 66 of 85 (77.7%) of the strains tested were killed at serum dilutions $\geq 1/128$ (Fig. 3a). This threshold titer correlates with a positive result using human complement (27). Killing of $\sim 78\%$ of the strains by a meningococcal B vaccine is very encouraging, especially when compared with the 17 of 85 strains (20%) and with the 18 of 85 strains (21.2%) killed by the OMV vaccines made from the Norwegian strain H44/76 (Fig. 3a, center column) and the New Zealand strain NZ98/254 (Fig. 3a, right column), which represent the best vaccines available so far.

A closer observation of the strains covered showed that the Nv vaccine induced BCA titers $>8,000$ against all 9 strains with PorA P1.16, identical to that of the vaccine strain, titers of 512 or lower against 8 strains carrying a different PorA, and no BCA against the remaining 68 strains. Similarly, the Nz vaccine induced high BCA titers against the 11 strains with PorA P1.4 identical to the vaccine strain, low BCA titers against 7 strains with different PorA, and no BCA against the remaining 67 strains. The poor coverage of strains and hypervirulent lineages provided by OMV vaccines (Fig. 3b) validates the fragmentary observations obtained so far in preclinical and clinical studies showing that OMV vaccines induce immunity that is mostly PorA-specific.

In marked contrast to the OMV vaccines, and as expected from the antigen composition, the 5CVMB vaccine induced broader protection that was not serosubtype-specific and covered most of the population diversity. The protection induced by 5CVMB formulated with aluminum (Fig. 3b) was complete (100%) against all strains of the panel from the hypervirulent cpx ST32 and ST8, almost complete (95%) against the hypervirulent cpx ST41/44, and substantial against strains of hypervirulent cluster ST11 and those classified as others (65% and 59%, respectively). A subset of strains, for which human complement could be used for the bactericidal assay, was killed by the vaccine-induced antibodies in the presence of human complement. For instance, the BCA titers obtained against MenB strains MC58, 2996, and NZ98/254 were 1,024, 128, and 64, respectively.

To investigate whether the coverage of the 5CVMB vaccine could be increased, mice were immunized with the same vaccine antigens but adjuvanted by aluminum hydroxide combined with CpG oligonucleotides (28, 29). The results showed that the strain coverage increased to 91.7% (Fig. 3c). We also tested the vaccine using an oil-in-water emulsion, MF59, which is licensed for human use in Europe, as adjuvant (30). The presence of the MF59 increased the coverage to 94.1% (Fig. 3c). Interestingly, when FCA was used as adjuvant, coverage by BCA reached 97.6% (Fig. 3c). The addition of CpG to 5CVMB with aluminum hydroxide or the use of MF59 or FCA (Fig. 3d) significantly increased the coverage of strains belonging to the ST11 cluster and of those classified as others. These data show that in mice the antigens included in the vaccine can induce

Table 2. Characteristics of 85 *N. meningitidis* strains used for bactericidal assays

Hypervirulent clusters	Year of isolation			Total
	Before 1980	1980–1995	1996–2002	
ST32 cpx (ET5)	1	4	6	11
ST41/44 cpx (lineage 3)	0	5	16	21
ST8 cpx (A4)	1	2	4	7
ST11 cpx (ET37)	2	4	11	17
Others*	3	8	18	29
Total	7	23	55	85

*The strains that do not belong to any of the hypervirulent clusters have been classified as others.

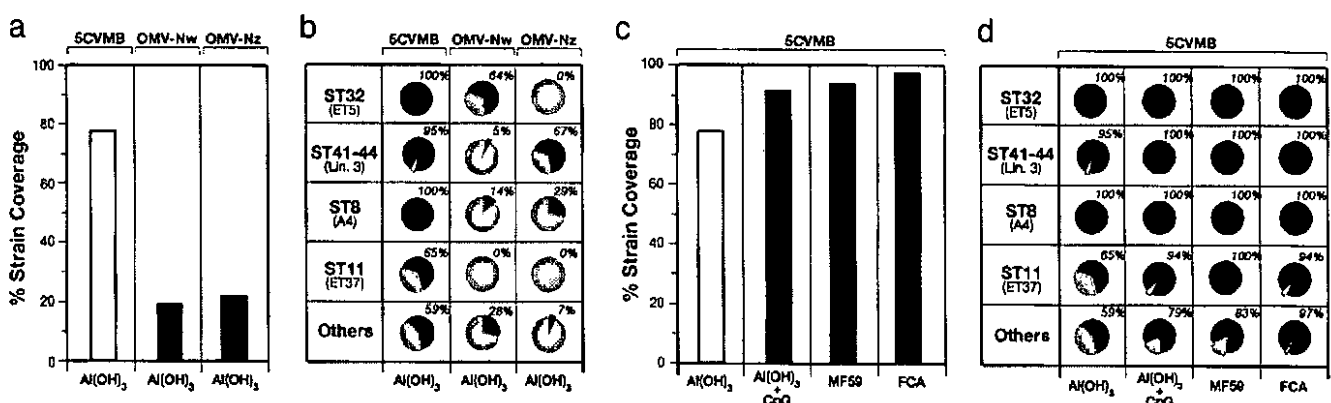


Fig. 3. Protective effect of 5CVMB vaccine. The analysis has been performed by testing the immune sera for BCA against 85 *N. meningitidis* strains using baby rabbit serum as complement source (16). Results are expressed as the percentage of strains killed with titers ≥ 128 . (a and b) Comparison of strain coverage induced by 5CVMB, OMV-Nw, and OMV-Nz vaccines (a) and the respective vaccine coverage of the 85 strains grouped into hypervirulent clusters (b). (c and d) Strain coverage induced by different formulations of 5CVMB vaccine (with aluminum hydroxide, aluminum hydroxide plus CpG 1826, MF59, or FCA) (c) and the respective vaccine coverage of hypervirulent clusters (d).

immunity against nearly all MenB strains when the immune response is optimized. The increased strain coverage could be due to the ability of the adjuvants to induce a higher immune response or to influence antigen conformation by exposing additional epitopes to the immune system. Further work will be needed to address this issue. In humans, the immune response can be optimized by the addition of CpG, by using MF59, or with a booster dose after primary immunization.

All animals treated with different formulations of 5CVMB vaccine were healthy throughout the experiments, based on daily observations, and no overt toxicity was observed.

To confirm that the antisera obtained were able to confer protection *in vivo*, representative sera from mice immunized with 5CVMB were also used for passive immunization of infant rats, which were subsequently challenged i.p. with MenB strain 2996. In two experiments where the animals were challenged with 6×10^4 and 5×10^3 virulent bacteria, respectively (Table 3), all infant rats that had received PBS as negative control developed a bacteremia after 18 h. In contrast, no bacteria were recovered from the blood of rats that had been passively immunized.

Discussion

We have described a universal vaccine against MenB, a bacterium that causes a disease against which conventional vaccinol-

ogy has been ineffective and that still kills many young people in both developed and developing countries. The vaccine, developed by using novel antigens identified by reverse vaccinology, covers 78% of the strains in the basic formulation using aluminum hydroxide as adjuvant, and coverage can be increased to $>95\%$ of the strains by using other adjuvants. The progress compared with vaccines available so far is gigantic; in fact, OMV vaccines, which are the best vaccines against MenB developed during the last 30 years, are shown to cover only 20% of the MenB strains.

The work also shows that universal protein-based vaccines can be developed against those encapsulated bacteria that are usually targeted by conjugate vaccines. This finding should foster research on reverse vaccinology to identify protein-based vaccines for other pathogens, such as pneumococcus, where there are too many serotypes of capsular polysaccharides to make conjugate vaccines capable of protecting against all strains, against *Staphylococcus*, group A *Streptococcus*, and other microorganisms.

Although protein-based vaccines have also been described for group B *Streptococcus* (31) and other pathogens, so far most of the data in the literature were obtained by using vaccines formulated with adjuvants unsuitable for human use, such as FCA, and usually tested against a limited number of bacterial strains, so that the coverage of the population diversity could not

Table 3. Passive protection in the infant rat meningococcal bacteremia model

Exp.	2996 (challenged CFU)	Treatment	Serum dilution or dose of mAb, μ g, per rat	No. positive/total	CFU/ml (geometric mean)
1	63,000	Anti-PorA(Pl.2) mAb	2	0/3	<1
		Anti-5CVMB mouse serum	1:5	0/3	<1
			1:20	0/3	<1
		Anti-5CVMB rabbit serum	1:5	0/3	<1
			1:20	0/3	5
2	5,000	PBS control		3/3	146,590
		Anti-PorA(Pl.2) mAb	1	0/4	<1
		Anti-5CVMB mouse serum	1:10	0/4	<1
			1:50	0/4	<1
		Anti-5CVMB rabbit serum	1:10	0/4	<1
			1:50	0/4	<1
		PBS control		4/4	8,250

CFU, colony-forming unit.

be totally predicted. Therefore, the question of whether protein-based vaccines against encapsulated bacteria are feasible for use in humans was still pending. In this study we have used the antigens derived from the genome mining of MenB, and we have asked the critical questions necessary for extending their large-scale use to humans. To do so, we expressed them in a system suitable for industrial manufacturing; we formulated them with an adjuvant suitable for human use, such as aluminum hydroxide, and we tested the immune response against an unusually large panel of strains enriched with recent clinical isolates and designed to represent as much as possible the true diversity of the bacterial population.

If the results reported here are confirmed in clinical trials, this vaccine is likely to conquer one of the most devastating diseases that still cause morbidity and mortality in children and adolescents.

Materials and Methods

Cloning Expression and Purification of Vaccine Components. Single recombinant proteins were expressed and purified as previously described (13, 16, 17). Genes considered in this study were from the genome of *N. meningitidis* NZ98/254 strain in the case of GNA2132, MC58 strain in the case of GNA1870, and 2996 strain in the case of GNA1030, GNA2091, and NadA.

All of the proteins present in the multicomponent vaccine 5CVMV were produced in *Escherichia coli* devoid of the predicted leader peptide using the pET24b+ as expression vector and *E. coli* BL21 (DE3) as expression host. NadA corresponds to the NadA_{351–405} recombinant form (17).

To generate the fusion GNA2132–1030, the *gna2132* gene was amplified by PCR from the NZ98/254 strain by using the following oligonucleotides: 2132 forward (CGCGGATC-CGCTAGC-CCCGATGTTAAATCGGC) and 2132 reverse (CGGGGATCC-ATCCTGCTCTTTTGGCCGG) containing the NheI and BamHI restriction sites, respectively (restriction sites are underlined); the *gna1030* gene was amplified from the 2996 strain by using 1030 forward (CGCGGATC-CGGTGGTGGTGGT-GCCACCTACAAAGTGGAC) and 1030 reverse (CCCGCTCGAG-TTATTGTTTGGCTGCTCGAT) oligonucleotides, which include the BamHI and XhoI restriction sites, respectively. A polyglycines linker was added between the two proteins of the fusion inserting the corresponding DNA sequence as tail in the sequence of the primer forward. The insertion of NheI and BamHI sites results in alanine-serine or glycine-serine additional amino acids, respectively.

Amplified DNA fragments were digested with NheI/BamHI and with BamHI/XhoI enzymes and cloned in pET24b+ vector digested with NheI/XhoI.

To create the fusion GNA2091–1870, the *gna2091* gene was amplified from the 2996 strain by using the oligonucleotides 2091 forward (CGCGGATCCCATATG-GTCAGCGCAGTA-ATCGGA) and 2091 reverse (CGGGGATCC-GCGTTG-GACGTAGTTTTG) containing the NdeI and BamHI restriction sites, respectively; the *gna1870* gene was amplified from the MC58 strain by using 1870 forward (CGCGGATCC-GGAGGGGGTGGTGTCTG) and 1870 reverse (CCCGCTC-GAG-TTATTGCTTGGCGGCAAG) oligonucleotides, including the BamHI and XhoI restriction sites, respectively.

Amplified DNA fragments were digested with NdeI/XhoI and BamHI/XhoI enzymes and cloned in pET24b+ vector digested with NdeI/XhoI.

The recombinant proteins were expressed in *E. coli* and purified by standard methods (32).

Mouse Immunizations. To prepare antisera, 20 μ g of individual antigens GNA2132, GNA1030, GNA2091, GNA1870, NadA, GNA2132–1030, and GNA2091–1870 or a combination of 20

μ g each of GNA2132–1030, GNA2091–1870, and NadA was used to immunize 6-week-old CD1 female mice (Charles River Breeding Laboratories). Five to 10 mice per group were used. The antigens were administered i.p. together with aluminum hydroxide (3 mg/ml) on days 0, 21, and 35. The same immunization schedule was performed with different adjuvants such as CpG 1826 plus aluminum hydroxide, MF59, or FCA. Blood samples for analysis were taken on day 49. To prepare antisera against OMV preparation (from H44/76 strain for NW and NZ98/254 strain for NZ), 10 μ g of each adsorbed to aluminum hydroxide was used. The same immunization schedule was used to immunize New Zealand White rabbits. The rabbits were injected in several lymph nodes with 5CVMV vaccine (25 μ g of each antigen). The treatments were performed in accordance with internal animal ethical committee and institutional guidelines.

FACS Analysis. The analysis was determined by using a FACScan flow cytometer as described previously (16). Polyclonal sera were tested at a 1/200 dilution. Antibody binding was detected by using a secondary anti-mouse (whole molecule) FITC-conjugated (Sigma) antibody.

Immunoelectron Microscopy. Whole-cell, negative-stain, ImmunoGold labeling was performed by using a modified procedure described by Fletcher *et al.* (22). Briefly, *N. meningitidis* serogroup B strains cells were fixed for 60 min at room temperature in 4% paraformaldehyde plus 0.05% glutaraldehyde in PBS (pH 7.2). After fixation, droplets of cells were placed on Formvar carbon-coated grids (Agar Scientific) for 5 min. Excess fluid was wicked off, and blocking was accomplished in two stages by using PBS plus 1% BSA for 5 min and, later, PBS containing 1% coldwater fish gelatin (Fluka) for 10 min. Excess aldehyde was quenched by using 0.02 M glycine in PBS for 5 min. Grids were inverted over polyclonal antibodies or mAbs (diluted in PBS plus 1% BSA) for 60 min in a humidified chamber. Grids were rinsed five times for 1 min in PBS plus 1% BSA. Antigen was detected by incubation for 60 min with goat anti-mouse IgG plus IgM conjugated to 10-nm colloidal gold beads (BB International, Cardiff, U.K.) diluted in PBS-BSA. Rinsing took place in PBS (four times for 1 min). Grids with cells were stabilized with 1% glutaraldehyde in PBS. Each sample was then rinsed five times in distilled water. Grids were finally treated with uranyl acetate and examined by a TEM GEOL 1200EX II transmission electron microscope.

Serum Bactericidal Assay. Serum BCA against *N. meningitidis* strains was evaluated as previously described (23). The complement source was pooled baby rabbit sera (Cedarlane Laboratories or Pel-Freeze Biologicals) or human serum from a healthy adult with no detectable intrinsic bactericidal activity.

Infant Rat Protection Assay. The ability of anti-5CVMV to confer protection against *N. meningitidis* bacteremia was evaluated as previously described in infant rats challenged i.p. (33). Bacteria numbers in the blood cultures were obtained by plating out onto chocolate agar 100 μ l of blood collected 18 h after challenge.

We thank Marco Tortoli, Giacomo Matteucci, and the animal care facility at Novartis Vaccines for technical assistance; Roberto Olivieri and Erwin Swennen for fermentations; Sandra Nuti for help with FACS analysis; Anna Rita Taddei for technical help with ImmunoGold labeling and transmission electron microscopy; Maria Scarselli for help in bioinformatics; and Cesira Galeotti, Duccio Medini, and Claudio Donati for discussion. We also thank Catherine Mallia for manuscript editing and Giorgio Corsi for artwork.

1. Gotschlich, E. C., Goldschneider, I. & Artenstein, M. S. (1969) *J. Exp. Med.* **129**, 1367–1384.
2. Gotschlich, E. C., Liu, T. Y. & Artenstein, M. S. (1969) *J. Exp. Med.* **129**, 1349–1365.
3. Caugant, D. A., Bovre, K., Gaustad, P., Bryn, K., Holten, E., Hoiby, E. A. & Froholm, L. O. (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132**, 641–652.
4. Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3140–3145.
5. World Health Organization (2001) *Wkly. Epidemiol. Rec.* **37**, 281–288.
6. Rosenstein, N. E., Perkins, B. A., Stephens, D. S., Lefkowitz, L., Cartter, M. L., Danila, R., Cieslak, P., Shutt, K. A., Popovic, T., Schuchat, A., *et al.* (1999) *J. Infect. Dis.* **180**, 1894–1901.
7. Noah, N. & Henderson, B. (2002) *Surveillance of Bacterial Meningitis in Europe 1997/8* (Communicable Disease Surveillance Centre, London), pp. 1–16.
8. Goldschneider, I., Gotschlich, E. C. & Artenstein, M. S. (1969) *J. Exp. Med.* **129**, 1307–1326.
9. Costantino, P., Viti, S., Podda, A., Velmonte, M. A., Nencioni, L. & Rappuoli, R. (1992) *Vaccine* **10**, 691–698.
10. Snape, M. D. & Pollard, A. J. (2005) *Lancet Infect. Dis.* **5**, 21–30.
11. Tappero, J. W., Lagos, R., Ballesteros, A. M., Plikaytis, B., Williams, D., Dykes, J., Gheesling, L. L., Carlone, G. M., Hoiby, E. A., Holst, J., *et al.* (1999) *J. Am. Med. Assoc.* **281**, 1520–1527.
12. Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J., Jeffries, A. C., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Ketchum, K. A., Hood, D. W., Peden, J. F., Dodson, R. J., *et al.* (2000) *Science* **287**, 1809–1815.
13. Pizza, M., Scarlato, V., Masignani, V., Giuliani, M. M., Arico, B., Comanducci, M., Jennings, G. T., Baldi, I., Bartolini, E., Capecchi, B., *et al.* (2000) *Science* **287**, 1816–1820.
14. Rappuoli, R. (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 445–450.
15. Litt, D. J., Savino, S., Beddek, A., Comanducci, M., Sandiford, C., Stevens, J., Levin, M., Ison, C., Pizza, M., Rappuoli, R. & Kroll, J. S. (2004) *J. Infect. Dis.* **190**, 1488–1497.
16. Masignani, V., Comanducci, M., Giuliani, M. M., Bambini, S., Adu-Bobie, J., Arico, B., Brunelli, B., Pieri, A., Santini, L., Savino, S., *et al.* (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 789–799.
17. Comanducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., Adu-Bobie, J., Arico, B., Capecchi, B., Giuliani, M. M., Masignani, V., Santini, L., Savino, S., *et al.* (2002) *J. Exp. Med.* **195**, 1445–1454.
18. Granoff, D. M., Moe, G. R., Giuliani, M. M., Adu-Bobie, J., Santini, L., Brunelli, B., Piccinetti, F., Zuno-Mitchell, P., Lee, S. S., Neri, P., *et al.* (2001) *J. Immunol.* **167**, 6487–6496.
19. West, D., Reddin, K., Matheson, M., Heath, R., Funnell, S., Hudson, M., Robinson, A. & Gorringe, A. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 1561–1567.
20. Gorringe, A. R., Reddin, K. M., Funnell, S. G., Johansson, L., Rytönen, A. & Jonsson, A. B. (2005) *Vaccine* **23**, 2214–2217.
21. Welsch, J. A., Moe, G. R., Rossi, R., Adu-Bobie, J., Rappuoli, R. & Granoff, D. M. (2003) *J. Infect. Dis.* **188**, 1730–1740.
22. Fletcher, L. D., Bernfield, L., Barniak, V., Farley, J. E., Howell, A., Knauf, M., Ooi, P., Smith, R. P., Weise, P., Wetherell, M., *et al.* (2004) *Infect. Immun.* **72**, 2088–2100.
23. Giuliani, M. M., Santini, L., Brunelli, B., Biolchi, A., Arico, B., Di Marcello, F., Cartocci, E., Comanducci, M., Masignani, V., Lozzi, L., *et al.* (2005) *Infect. Immun.* **73**, 1151–1160.
24. Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Di Marcello, F., Ciocchi, L., Masignani, V., Taddei, A., Rappuoli, R., Pizza, M. & Arico, B. (2005) *Mol. Microbiol.* **55**, 687–698.
25. Olin, P., Rasmussen, F., Gustafsson, L., Hallander, H. O. & Heijbel, H. (1997) *Lancet* **350**, 1569–1577.
26. Barocchi, M. A., Masignani, V. & Rappuoli, R. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 349–358.
27. Andrews, N., Borrow, R. & Miller, E. (2003) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 780–786.
28. Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J. & Krieg, A. M. (1998) *J. Immunol.* **160**, 870–876.
29. Weeratna, R. D., McCluskie, M. J., Xu, Y. & Davis, H. L. (2000) *Vaccine* **18**, 1755–1762.
30. Podda, A. & Del Giudice, G. (2003) *Expert Rev. Vaccines* **2**, 197–203.
31. Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C. D., Masignani, V., Mora, M., Scarselli, M., Tettelin, H., Brettoni, C., Iacobini, E. T., Rosini, R., *et al.* (2005) *Science* **309**, 148–150.
32. Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W. & Wingfield, P. T., eds. (1997) *Current Protocols in Protein Science* (Wiley, New York), pp. 6.0.1–6.7.14, 9.4.1–9.4.16.
33. Moe, G. R., Tan, S. & Granoff, D. M. (1999) *Infect. Immun.* **67**, 5664–5675.

17

DIVISIONAL
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS
S.A.

EXPEDIENTE No. 05-007.266B



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. **05-007.266B**

54. TITULO **"COMPOSICIONES DE VACUNA DE**
NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA
COMBINACIÓN DE ANTÍGENOS"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL **A61K 39/095**

71. SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A.**

DOMICILIO **Rixensart, Bélgica**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

72. BOGOTA, D.C.

(FORMA P 10)

**FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSION, DIVISIÓN Y FUSION DE
SOLICITUDES
2000-14**

①

SOLICITUD DE RENUNCIA:

☐

Conversión.

☒

División.

☐

Fusión.

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Registro de diseño Industrial.

☐

Esquemas de trazado para Circuitos Integrados.

②

SOLICITANTE

Nombre: **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**,
sociedad organizada y existente de conformidad con
las leyes Bélgica.

Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart,
Bélgica.

Teléfono: 326-42-70 Fax: 606-97-01

E-mail: jllcc@lloredacamacho.com

Domicilio: Rixensart, Bélgica.

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número _____

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **ALICIA LLOREDICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º., Bogotá-
Colombia

Teléfono: 326-4270 Fax: 606-97-01

E-mail: jllcc@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número _____ TP 53.215

④

CONVERSION

Expediente No: _____

De: _____

A: _____

⑤

DIVISION

Expediente No: 05-007.266B

No. de divisionales: Una(1)

⑥

FUSION

Expediente No: _____

Expediente No: _____

⑦

Comprobante de pago No. 11-0021246

Fecha Marzo 8 de 2011

⑧

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☒

Poderes, si fuere el caso

☒

Certificado de existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

☒

Copia de la solicitud divisional.

⑨

NOMBRE: ALICIA LLOREDICAURTE

FIRMA: 

C.C. 39.690.713 Btá T.P. 53.215

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / - -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0021246
		Bogotá D.C., Marzo 08 de 2011 - 06:32:01

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.					NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO	
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	414995081	07/03/2011	26.246.000.00	

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 05-007266-A-00006-0000
Fecha: 2011-04-04 17:24:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 188

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 05-007266-A-00006-0000
Fecha: 2011-04-04 17:24:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 205

Yo, el infrascrito, JAMES KERR MILLIGAN, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

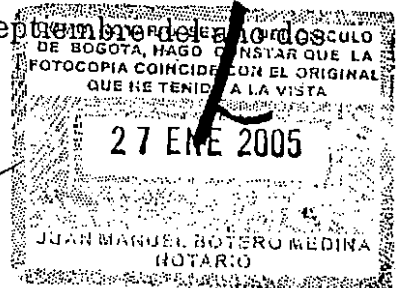
C E R T I F I C O:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A." (anteriormente denominada "Smithkline Beecham Biologicals s.a."), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.



JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by
a été signé par

James Keef Milligan

Notary Public

COMP NOTARIO TEXTO
de Buenos Aires
FOTOCAGISSACION QUELLE DE LOS
QUE HE TENIDO A LA VISTA
bears the seal/stamp of
es el original de

Certified/Attesté

6. the/le

04 SEP 2004

by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No

G-749037

9. Stamp/
timbre:



10. Signature:

WGLASS

WGLASS

For the Secretary of State/Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los asuntos relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno tanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

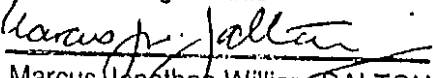
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

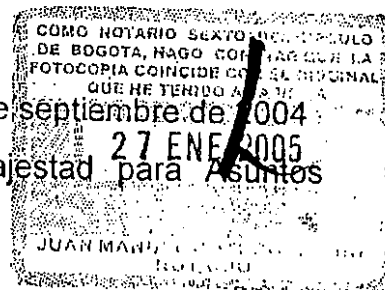
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: G 749037
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
GUAYAQUIL D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567

Ante E. S. O. P. A.
CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD DEL
DOCUMENTO DE LA
BASE DE DATOS DE LA
DIRECCION GENERAL DE
RELACIONES EXTERIORES
ENE 2005
DEL EXTERIOR GUAYANA
NOTARIO

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

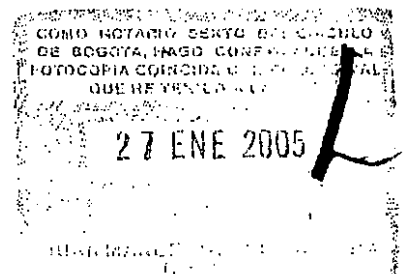
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es auténtica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No.° de solicitud: 05-007.266B		(51) Int Cl: A61K 39/095	
(22) Fecha de solicitud: 28-01-05		(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
		(72) Inventor(es) BERTHET, Francois-Xavier, Jacques; BIEMANS, Ralph; DENOEL, Philippe; FERON, Christiane; GORAJ, Carine; POOLMAN, Jan y WEYNANTS, Vincent.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) Pais
	0218037.0 0225524.8	02/08/02 01/11/02	GB
	0218036.2 0225531.3	02/08/02 01/11/02	GB
	0218035.4 0230164.6	02/08/02 24/12/02	GB
	0218051.1 0230168.7	02/08/02 24/12/02	GB
	0220197.8 0230170.3	30/08/02 24/12/02	GB
	0220199.4 0305028.3	30/08/02 05/03/03	GB
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 02-03-05		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 19-02-04	
Fecha de presentación de la solicitud: 31-07-03		N° publicación: WO 2004/014418 A3	
No. de solicitud PCT/EP2003/008571			
(64) Título: COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA COMBINACION DE ANTIGENOS			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Una composición inmunogénica que comprende por lo menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionada del grupo que consiste de Hsf y Hap, y al menos un antígeno diferente seleccionado de las siguientes categorías:

- a) por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, Hsf y Hap;
 - b) por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FrpC y FrpA/C;
 - c) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28 y NMB0964; o
 - d) por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, y GNA1870;
- y en donde los antígenos, cuando están presentes en una vesícula de membrana exterior, han sido regulados en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION _ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL _

(21) N° de solicitud: 05-007.266B (22) Fecha de solicitud: 28-01-05

/51) Clasificación Internacional: A61K 39/095

(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

(72) Inventor(es): BERTHET, Francois-Xavier, Jacques; BIEMANS, Ralph; DENOEL, Philippe; FERON, Christiane; GORAJ, Carine; POOLMAN, Jan y WEYNANTS, Vincent.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0218037.0 0225524.8	02/08/02 01/11/02	GB
	0218036.2 0225531.3	02/08/02 01/11/02	GB
	0218035.4 0230164.6	02/08/02 24/12/02	GB
	0218051.1 0230168.7	02/08/02 24/12/02	GB
	0220197.8 0230170.3	30/08/02 24/12/02	GB
	0220199.4 0305028.3	30/08/02 05/03/03	GB

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 02-03-05

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 19-02-04

Fecha de presentación de la solicitud: 31-07-03

N° publicación: WO2004/014418A3

No. de solicitud PCT/EP2003/08571

(54) Título: COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA COMBINACION DE ANTIGENOS



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud: 05-007.266B (22) Fecha de solicitud: 28-01-05

(51) Clasificación Internacional: A61K 39/095

(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

(72) Inventor(es): BERTHET, Francois-Xavier, Jacques; BIEMANS, Ralph; DENOEL, Philippe; FERON, Christiane; GORAJ, Carine; POOLMAN, Jan y WEYNANTS, Vincent.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0218037.0 0225524.8	02/08/02 01/11/02	GB
	0218036.2 0225531.3	02/08/02 01/11/02	GB
	0218035.4 0230164.6	02/08/02 24/12/02	GB
	0218051.1 0230168.7	02/08/02 24/12/02	GB
	0220197.8 0230170.3	30/08/02 24/12/02	GB
	0220199.4 0305028.3	30/08/02 05/03/03	GB

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 02-03-05

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 31-07-03
No. de solicitud PCT/EP2003/008571

(87) Publicación internacional:

Fecha: 19-02-04

No. Publicación: WO2004/014418 A3

(54) Título: COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA COMBINACION DE ANTIGENOS

(57) Resumen:

Reivindicación 1.-

Una composición inmunogénica que comprende por lo menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionada del grupo que consiste de Hsf y Hap, y al menos un antígeno diferente seleccionado de las siguientes categorías:

- por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, Hsf y Hap;
- por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FrpC y FrpA/C;
- por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28 y NMB0964; o
- por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, y GNA1870;

y en donde los antígenos, cuando están presentes en una vesícula de membrana exterior, han sido regulados en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.

COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN
UNA COMBINACION DE ANTIGENOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas y vacunas para el tratamiento y prevención de enfermedad Neisserial. Las composiciones inmunogénicas de la invención contienen combinaciones de antígenos seleccionados de
10 por lo menos dos diferentes clases de antígenos incluyendo adhesinas, proteínas autotransportadoras, toxinas, proteínas de adquisición de hierro, y proteínas asociadas con membrana (preferiblemente proteínas de membrana exterior integral). Dichas combinaciones de antígenos son capaces de activar la respuesta
15 inmune contra diferentes aspectos del ciclo de vida Neisserial, dando como resultado una respuesta inmune más efectiva.

20

**COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN
UNA COMBINACION DE ANTIGENOS**

CAMPO TECNICO

5

La presente invención se refiere al campo de composiciones inmunogénicas y vacunas de Neisserial, su fabricación y al uso de dichas composiciones en medicina. Más particularmente, se refiere a composiciones de vacuna que comprenden una combinación de
10 antígenos que tienen cualidades que permiten a las vacunas de la invención provocar una respuesta inmune sorprendentemente buena según medido en un ensayo de protección o un ensayo bactericida de suero.

15

ANTECEDENTES

Las cepas de Neisserial de bacteria son los agentes causantes de un número de patologías humanas, contra los cuales existe una necesidad de que se desarrollen vacunas efectivas. En particular la
20 *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* causan patologías que podrían tratarse a través de vacunación.

Neisseria gonorrhoeae es el agente etiológico de gonorrea, una de las enfermedades sexualmente transmitidas más frecuentemente reportadas en el mundo con una incidencia anual estimada de 62
25 millones de casos (Gerbase y otros, 1998 Lacet 351; (Supl. 3) 2-4).

Las manifestaciones clínicas de la gonorrea incluyen inflamación de las membranas mucosas del tracto urogenital, la garganta o recto e infecciones de ojo neonatales. El aumento de las infecciones por gonococo en las mujeres puede conducir a la infertilidad, embarazo
5 extrauterino, enfermedad inflamatoria pélvica crónica, y formulación de abscesos tubo-ováricos. La septicemia, artritis, endocarditis y meningitis están asociadas con gonorrea complicada.

El alto número de cepas gonocócicas con resistencia a antibióticos contribuye al aumento de la morbilidad y
10 complicaciones asociadas con gonorrea. Una alternativa agradable para el tratamiento de gonorrea con antibióticos podría ser su prevención utilizando vacunación. Actualmente no existe ninguna vacuna para infecciones por *N. gonorrhoeae*.

La *Neisseria meningitidis* es un patógeno importante,
15 particularmente en niños y adultos jóvenes. La septicemia y la meningitis son las formas con más peligro de muerte de la enfermedad meningocócica invasora (IMD). Esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud mundial debido a su alta morbilidad y mortalidad.

20 Trece serogrupos de *N. meningitidis* han sido identificados en base a las diferencias antigénicas en los polisacáridos capsulares, los más comunes siendo A, B y C, los cuales son reponsables del 90% de la enfermedades alrededor del mundo. El serogrupo B es la causa más común de la enfermedad meningocócica en Europa, EUA y
25 varios países en América Latina.

Las vacunas basadas en el polisacárido capsular de los serogrupos A, C, W e Y han desarrollado y han mostrado que controlan los brotes de la enfermedad meningocócica (Peltola y otros, 1985 *Pediatrics* 76; 91-96). Sin embargo, el serogrupo B es

5 pobremente inmunogénico e induce solamente una respuesta de anticuerpo temporal de un isotipo predominantemente IgM (Ala'Aldeen D y Cartwright K 1996, *J. Infect.* 33; 153-157). Por consiguiente no existe una vacuna ampliamente efectiva actualmente disponible contra los meningococos del serogrupo B, los cuales son

10 responsables de la mayoría de las enfermedades en los países más templados. Esto es particularmente problemático ya que la incidencia de la enfermedad del serotipo B está aumentando en Europa, Australia y América, en su mayor parte en niños menores de 5 años. El desarrollo de una vacuna contra los meningococos del serogrupo

15 B presenta dificultades particulares porque la cápsula del polisacárido es pobremente inmunogénico debido a su similitud inmunológica a la molécula de adhesión de la célula neural humana. Las estrategias para la producción de vacunas tienen por consiguiente concentradas en la superficie, estructuras expuestas de

20 la membrana exterior meningocócica pero han sido obstaculizadas a través de la variación marcada en estos antígenos entre las cepas.

Los desarrollos adicionales han conducido a la introducción de vacunas hechas de vesículas de membrana externas que contendrán un número de proteínas que forman el contenido normal de la

25 membrana bacterial. Una de estas es la vacuna VA-MENGOC-BC®

Cubana contra los serogrupos B y C de *N. meningitidis* (Rodriguez y otros 1999 Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94; 433-440). Esta vacuna fue diseñada para combatir un brote de la enfermedad meningocócica invasora en Cuba, la cual no había sido eliminada a través de un programa de vacunación utilizando una vacuna AC de polisacárido capsular. Los serogrupos B y C prevalentes y la vacuna VA-MENGOC-BC tuvieron éxito en el control del brote con una eficiencia de vacuna estimada de 83% contra las cepas del serogrupo B de *N. meningitidis* (Sierra y otros 1990 In Neisseria, Walter Gruyter, Berlin, m. Atchman y otros (eds) p 129-134, Sierra y otros 1991, NIPH Ann 14; 195-210). Esta vacuna fue efectiva contra un brote específico, sin embargo la respuesta inmune provocada no protegería contra otras cepas de *N. meningitidis*.

Los estudios de eficacia subsiguientes conducidos en América Latina durante las epidemias causadas por cepas meningocócicas de serogrupo B homólogas y heterólogas han mostrado alguna eficacia en niños más grandes y adultos, pero su efectividad fue significativamente baja en niños más chicos que están en un riesgo mayor de infección (Milagres y otros 1994, Infect. Immun. 62; 4419-4424). Es cuestionable que tan efectiva dicha vacuna podría ser en países con enfermedad endémica multicepas tales como el Reino Unido. Los estudios de inmunogeneicidad contra cepas heterólogas han demostrado solamente actividad bactericida de suero inter-reactiva limitada, especialmente en infantes (Tappero y otro 1999, JAMA 281; 1520-1527).

Una segunda vacuna de vesícula membrana externa fue desarrollada en Noruega utilizando un serotipo B aislado típico de aquellos predominantes en Escandinava (Fredriksen y otros 1991, NIPH Ann, 14; 67-80). Esta vacuna se probó en evaluaciones clínicas y se probó que tiene una eficacia protectora después de 29 meses de 5 57% (Bjune y otro 1991, Lancet, 338; 1093-1096).

Sin embargo, el uso de vesículas de membrana externa es vacunas está asociado con algunos problemas. Por ejemplo, el OVM contiene lipopolisacáridos tóxicos y pueden contener antígenos 10 inmunodominantes los cuales son ya sea específicos de cepa o se expresan variablemente. Varios procesos han descrito que se podría utilizar para superar algunos de los problemas de las vacunas de preparación de vesícula de membrana externa. WO01/09350 describe los procesos que tratan algunos de estos problemas, por ejemplo 15 reduciendo la toxicidad y modificando los antígenos presentes en sus vesículas de membrana externa.

WO 01/52885 describe la posibilidad de combinar vesículas de membrana externa con otros antígenos y una lista de más de 2,000 proteínas Neisserial se incluye a partir de la cual se especula que 20 una vacuna eficaz contra un rango más amplio de serotipos podría desarrollarse.

Existen diversos problemas con las vacunas anti-meningocócicas actualmente disponibles. Las vacunas de membrana externa en base a proteína tienden a ser específicas y efectivas 25 contra solamente unas cuantas cepas. Las vacunas de polisacáridos

también son subóptimas ya que tienden a provocar respuestas pobres y cortas, particularmente contra el serogrupo B (Lepow y otros 1986; Peltola 1998, Pediatrics 76; 91-96).

Las infecciones *Neisseria* representan un problema del cuidado de la salud considerable para el cual no existen vacunas disponibles en el caso de *N. gonorrhoeae* o las vacunas con limitaciones en su eficacia y habilidad para proteger contra cepas heterólogas están disponibles contra infecciones *Neisseria* que mejorarán las vacunas actualmente disponibles y permitirán la protección contra un rango más amplio de cepas.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Detección de TbpA y Hsf en OMVs preparadas de una cepa de *N. meningitidis* regulada de manera ascendente para la expresión de *tbpA* y *hsf*. La separación de las preparaciones OVM (10 µg) a través de análisis SDS-PAGE (4-20% geles de gradiente) se tiñó con azul brillante Coomassie.

Figura 2. Detección del dominio pasajero Hsf recombinante producido en *E. coli*, 10 µg de proteína pasajera Hsf purificada (Carriles 2 y 3) se separó a través de SDS-PAGE en 12% de gel en comparación con un marcador de peso molecular (Carril 1).

Figura 3. Análisis de la pureza del pasajero Hsf según detectado a través de (A) tinción Coomassie, (B) tinción plata, (C) tinción Western anti-His5 y (D) anti-*E. coli* 10 µg de antígenos

purificados se separaron a través de SDS-PAGE en un gel gradiente de archilamida al 4-20%.

Figura 4. Las regiones de la similitud de secuencia compartidas a través de proteínas FrpA y FrpC se aislaron de la cepa *N. meningitidis* FAM20. (A) Organización del dominio de la cepa de *N. meningitidis* FAM20 RTX proteínas FrpA y FrpC. (B) Productos de amplificación FrpA/C obtenidos de la cepa *N. meningitidis* H44/76.

Figura 5. Expresión del antígeno Frp23 recombinante (región conservada FrpA/C con 23 repeticiones) en análisis SDS-PAGE de *E. coli* de extractos de célula totales no inducidos (NI) e inducidos (I) de *E. coli* BL21DE3 transformado con vectores de control (pET24d) o construcciones recombinantes (Frp3, Frp13 y Frp23 respectivamente). Los geles se tiñeron con azul Coomassie (A) o se transfirieron a nitrocelulosa y suero de ratón anti-His6 inmuno- detectado.

Figura 6. Secuencias de ADN preferidas del fragmento FHAB/2/3° expresadas en *E. coli*.

Figura 7. Purificación de FHAB 2/3° de extractos de *E. coli* B121DE3. (A) Pasos principales en el proceso de purificación. (B) Análisis SDS-PAGE de fracciones de proteína amplificadas en diferentes pasos del proceso de purificación.

Figura 8. Actividades de bloqueo de adhesión de anti-suero dirigido contra FHAB 2/3°, Hap, dominio pasajero Hap, Hsf y antígenos del dominio pasajero Hsf de *N. meningitidis*.

Figura 9. Un gel teñido con Coomassie mostrando los niveles

de expresión de Hsf, TbpA y NspA en las preparaciones de la vesícula de membrana exterior derivada de diferentes cepas de *N. meningitidis*. Carril 1 – marcadores de peso molecular; carril 2 – vesículas de la membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares fueron regulados de manera descendente; carril 3 – vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente; carril 4 – vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente y Hsf fue regulado de manera ascendente; carril 6- vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente y TbpA fue regulado de manera ascendente; carril 7 - vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente y TbpA y Hsf fueron regulados de manera ascendente; carril 8 - vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente y TbpA y NspA fueron regulados de manera ascendente.

DESCRIPCION DETALLADA

La presente invención describe combinaciones particulares de

antígenos Neisserial que cuando se combinan, conducen a un mejoramiento sorprendente de la eficacia de la vacuna contra infección Neisserial.

Las infecciones Neisserial progresan a través de varias
5 diferentes etapas. Por ejemplo, el ciclo de vida meningocócica involucra colonización nasofaríngea, adhesión mucosal, cruzamiento dentro de la corriente sanguínea, multiplicación en la sangre, inducción de choque tóxico, cruce de la barrera sangre/cerebro, y multiplicación en el fluido cerebroespinal y/o las meninges.
10 Diferentes moléculas sobre la superficie de las bacterias estarán involucradas en diferentes pasos del ciclo de la infección. La activación de la respuesta inmune contra una cantidad efectiva de una combinación de antígenos particulares, se involucra en diferentes procesos de infección Neisserial, una vacuna Neisserial
15 son una sorprendentemente alta eficacia puede ser lograda.

En particular, las combinaciones de ciertos antígenos de diferentes clases, algunas de las cuales están involucradas en la adhesión de células huésped, algunas de las cuales están involucradas en adquisición de hierro, algunas de las cuales son
20 autotransportadoras y algunas de las cuales son toxinas, puede provocar una respuesta inmune que protege contra múltiples etapas de la infección. Dichas combinaciones de antígenos pueden sorprendentemente dirigirse hacia el mejoramiento (preferiblemente sinérgicamente mejorado) de la eficacia de la vacuna contra
25 infección Neisserial, en donde se activa más de una función de la

bacteria a través de la respuesta inmune en una forma óptima.

La eficacia de las vacunas puede ser evaluada a través de una variedad de ensayos. Los ensayos de protección en modelos de animales con bien conocidos en la técnica. Además, el ensayo bactericida de suero (SBA) es el marcador inmunológico más comúnmente acordado para estimar la eficacia de una vacuna meningocócica (Perkins y otros, J. Infect. Dis. 1998, 177:683-691).

Algunas combinaciones de antígenos (por ejemplo, combinaciones de ciertas proteínas autotransportadoras y ciertas proteínas de adquisición de hierro) pueden conducir hacia una protección mejorada en ensayos de modelos de animales y/o dosificaciones SBS sinérgicamente más altas. Sin desear estar ligado por teoría, dichas combinaciones sinérgicas de antígenos son habilitadas mediante un número de características de la respuesta inmune a la combinación de antígenos. Los antígenos mismos son usualmente expuestos en la superficie sobre las células Neisserial y tienden a ser conservados, pero también tienden a estar presentes en una cantidad suficiente en la célula de superficie para que una respuesta bactericida óptima tome lugar utilizando anticuerpos provocados contra el antígeno solo. Al combinar los antígenos de la invención puede dar como resultado una formulación que provoca una combinación ventajosa de anticuerpos bactericidas que interactúan con la célula Neisserial más allá de un umbral crítico. En este nivel crítico, suficientes anticuerpos de suficiente calidad se enlazan a la superficie de las bacterias para permitir una

aniquilación eficiente a través de complementos y se ven efectos bactericidas mucho más altos como una consecuencia.

Ya que los ensayos bactericidas de suero (SBA) estrechamente reflejan la eficacia de los candidatos de vacuna que logran buenas dosificaciones de SBA a través de una combinación de antígenos es una buena indicación de la eficacia protectora de una vacuna que contiene esa combinación de antígenos. La invención se refiere al uso de una combinación de dos antígenos ya sea aislados o enriquecidos en una mezcla de otros antígenos. Cuando se combinan, dichas combinaciones de antígenos interactúan ventajosamente, y preferiblemente sinérgicamente provocan una respuesta inmune que es más alta en términos de actividad bactericida (por ejemplo, según medido a través del ensayo bactericida de suero o SBA), y preferiblemente más alta que la respuesta aditiva provocada por los antígenos individualmente, más preferiblemente por un factor de por lo menos 1.2, 1.5, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, más preferiblemente por un factor de por lo menos diez.

Una ventaja adicional de la invención es que la combinación de antígenos de la invención de diferentes familias de proteínas en una composición inmunogénica puede habilitar la protección contra un rango más amplio de cepas.

La invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden una pluralidad (dos o más) de proteínas seleccionadas de por lo menos dos diferentes categorías de proteína, que tienen

diferentes funciones dentro de Neisseria. Ejemplos de dichas categorías de proteínas son adhesinas, proteínas autotransportadoras, toxinas, proteínas de membrana exteriores integrales, y proteínas de adquisición de Fe. Las combinaciones de vacunas de la invención muestran una sorprendente mejora en la eficacia de la vacuna contra cepas Neisserial homólogas (cepas a partir de las cuales los antígenos se derivan) y preferiblemente también contar cepas Neisserial heterólogas.

La invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden por lo menos o exactamente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nuevo o diez diferentes antígenos seleccionados de por lo menos o exactamente dos, tres, cuatro o las cinco categorías de antígenos seleccionados de los siguientes:

- por lo menos una adhesina Neisserial;
- por lo menos una autotransportadora Neisserial;
- por lo menos una toxina Neisserial;
- por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial;
- por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior, particularmente proteína de membrana exterior integral).

Preferiblemente, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden por lo menos o exactamente, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez diferentes antígenos Neisseria. Más preferiblemente estos antígenos se seleccionan del por los menos o exactamente dos, tres, cuatro o

cinco grupos de proteínas seleccionados a partir de lo siguiente:

- por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, PilC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB 0315, NMB 0995, NMB 1119 y NadA;
- por lo menos un autotransportador de Neisserial seleccionado del grupo que consiste de Hsf, Hap, proteasa IgA, AspA y NadA;
- por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS e inmunotipo L3 de LPS;
- por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, Lipo28 (GNA2132), Sibp, NMB0964, NMB0293, FbpA, Bcp, BfrA, BfrB y P2086 (XthA); y
- por lo menos una proteína asociada con membrana Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior, particularmente proteína de membrana exterior integral, seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, FhaC, NspA, TbpA, LbpA, TspA, TspB, TdfH, PorB, MltA, HpuB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA (GNA1946), NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, y PldA (OmplA).

Los antígenos de la presente invención todos están aislados, significando que están alterados a través de la mano del hombre. Preferiblemente están purificados el algún grado, más preferiblemente más de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, o 99% puros

(antes de la combinación con los otros componentes de las composiciones inmunogénicas de la invención).

Preferiblemente la composición inmunogénica de la invención comprende por lo menos una adhesina Neisserial y por lo menos un
5 autotransportador Neisserial y opcionalmente una toxina Neisserial, una proteína de adquisición de Fe Neisserial o una proteína de membrana asociada con la membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral). Preferiblemente, los
10 antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención comprende por lo menos una adhesina Neisserial y por lo menos una toxina Neisserial y opcionalmente un autotransportador Neisserial, una proteína de adquisición de Fe Neisserial, o una proteína
15 asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral). Preferiblemente, los antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención comprende por lo menos una adhesina Neisserial y por lo menos una
20 proteína de adquisición de Fe Neisserial, y opcionalmente una toxina Neisserial o una proteína asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral). Preferiblemente, los antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

25 Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención

comprende por lo menos una adhesina Neisserial y por lo menos una proteína asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral) y opcionalmente una toxina Neisserial, una proteína de adquisición de Fe Neisserial, o un autotransportador Neisserial. Preferiblemente, los antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención comprende por lo menos un autotransportador Neisserial y por lo menos una toxina Neisserial y opcionalmente una adhesina Neisserial, una proteína de adquisición de Fe Neisserial o una proteína asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral). Preferiblemente, los antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención comprende por lo menos un autotransportador Neisserial y por lo menos proteína de adquisición de Fe Neisserial, y opcionalmente una adhesina Neisserial, una toxina Neisserial, o una proteína asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral). Preferiblemente, los antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención comprende por lo menos un autotransportador Neisserial y por lo menos una proteína asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral) y

opcionalmente una adhesina Neisserial, o proteína de adquisición de Fe Neisserial o una toxina Neisserial. Preferiblemente, los antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención
5 comprende por lo menos una toxina Neisserial y por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial y opcionalmente una adhesina Neisserial, un autotransportador Neisserial o una proteína asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral). Preferiblemente, los antígenos se
10 seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención comprende por lo menos una toxina Neisserial y por lo menos una proteína asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral) y opcionalmente una
15 adhesina Neisserial, un autotransportador Neisserial o una toxina Neisserial. Preferiblemente, los antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención comprende por lo menos una proteína de adquisición de Fe
20 Neisserial y por lo menos una proteína asociada con membrana Neisserial (preferiblemente proteína de membrana exterior integral) y opcionalmente una adhesina Neisserial, un autotransportador Neisserial o una toxina Neisserial. Preferiblemente, los antígenos se seleccionan del los antígenos nombrados anteriormente.

25 Preferiblemente los cinco grupos de antígeno se representan

en la composición inmunogénica de la invención.

En donde una proteína está específicamente mencionada aquí, es preferiblemente una referencia a una proteína de longitud completa, nativa, y a sus variantes naturales (es decir, a una proteína nativa que se obtiene de una *Neisseria*, preferiblemente cepa meningocócica) pero también puede abarcar fragmentos antigénicos de la misma (particularmente en el contexto de vacunas de subunidad). Estas son fragmentos (por lo general específicamente descritos aquí) que contienen o comprenden por lo menos 10 aminoácidos, preferiblemente 20 aminoácidos, más preferiblemente 30 aminoácidos, más preferiblemente 40 aminoácidos o de preferencia 50 aminoácidos tomados contiguamente de secuencias de aminoácido de la proteína. Además, los fragmentos antigénicos denotan fragmentos que son inmunológicamente reactivos con anticuerpos generados contra las proteínas de longitud completa *Neisseria* o con anticuerpos generados a través de infección de un huésped mamífero con *Neisseria*. Los fragmentos antigénicos también incluyen fragmentos que cuando se administran a una dosis efectiva, provocan una respuesta protectora contra infección *Neisseria*, más preferiblemente son protectoras contra *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae*, más preferiblemente son protectores contra infección del serogrupo B por *N. meningitidis*.

También se incluyen en la invención proteínas de fusión recombinantes de proteínas *Neisseria* de la invención, o fragmentos de las mismas. Estas pueden combinar diferentes proteínas

Neisserial o fragmentos de las mismas en el mismo polipéptido. Alternativamente, la invención también incluye proteínas de fusión de proteínas Neisserial o fragmentos de las mismas, como una proteína de fusión con secuencias heterólogas tales como un proveedor de
 5 epítopos de células T o etiquetas de purificación, por ejemplo, β -galactosidasa, glutatona-S-transferasa, proteínas fluorescentes verdes (GFP), etiquetas de epítipo tales como FLAG, etiqueta myg, poli histidina, o proteínas de superficie virales tales como hemaglutinina de virus de influenza, anatoxina del tétanos, anatoxina
 10 de difteria, CRM197.

Antígenos de la invención

Las referencias NMB se refieren a números de referencia de secuencias que pueden ser accedidas a partir de www.neisseria.org.

15

1. Adhesinas

Las adhesinas incluyen FhaB (W098/02547), NadA (J. Exp. Med (2002) 195:1445; NMB 1994), Hsf también conocida como NhhA (NMB 0992)(W099/31132), Hap (NMB1985)(WO99/55873),
 20 NspA(W096/29412), MafA (NMB 0652) y MafB (NMB 0643) (Annu Rev Cell Dev Biol. 16; 423-457 (2000); Nature Biotech 20;914-921 (2002)), Omp26 (NMB 0181), NMB 0315, NMB 0995, NMB 1119 y PilC (Mol. Microbiol. 1997,23; 879-892). Estas son proteínas que están involucradas en la unión de Neisseria a la superficie de células
 25 huésped. Hsf es un ejemplo de una adhesina, así como también una

proteína autotransportadora. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden por consiguiente incluir combinaciones de Hsf y otras proteínas autotransportadoras en donde Hsf contribuye en su capacidad como una adhesina. Estas adhesinas pueden derivarse de

5 *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* u otras cepas de *Neisseria*. La invención también incluye otras adhesinas de *Neisseria*.

FhaB

10 Este antígeno ha sido descrito en WO98/02547 SEC ID NO: 38 (nucleótidos 3083-9025) – ver también NMB0497. Los inventores de la presente han encontrado a FhaB como siendo particularmente efectivo en la inducción de anticuerpos anti-adhesivos solos y en particular con otros antígenos de la invención. Aunque se puede

15 utilizar FhaB de longitud completa, los inventores han encontrado que los truncados C-terminal particulares son sorprendentemente por lo menos tan efectivos y preferiblemente aún más efectivos en términos de efecto inter-cepa. Dichos truncados también han mostrado ventajosamente ser mucho más fáciles de clonar. Los

20 truncados FhaB de la invención típicamente corresponden a dos tercios de N-terminal de la molécula FhaB, preferiblemente el nuevo C-término siendo situado en la posición 1200-1600, más preferiblemente en la posición 1300-1500, y más preferiblemente en la posición 1430-1440. Las modalidades específicas tiene el C-

25 término en 1433 o 1436. Por consiguiente dichos truncados FhaB de

la invención y las vacunas que comprenden dichos truncados son aspectos independientes de la presente invención así como siendo componentes de las composiciones inmunogénicas de combinación de la invención. El N-término también puede estar truncado hasta por
 5 10, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos.

2. *Proteínas autotransportadoras*

Las proteínas autotransportadoras típicamente están hechas de una secuencia de señal, un dominio pasajero y un dominio de anclaje
 10 para adherirse a la membrana exterior. Ejemplos de proteínas autotransportadoras incluye Hsf (W099/31132) (NMB 0992), HMW, Hia (van Ulsen y otros Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53-64), Hap (NMB1985) (W099/55873; van Ulsen y otros Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53-64), UspA, UspA2, NadA (NMB 1994)
 15 (Comanducci y otros J. Exp. Med. 2002 195; 1445-1454), AspA (Infection and Immunity 2002, 70(8); 4447-4461; NMB 1029), Aida-1 de tipo proteína, SSh-2 y Tsh. NadA (J. Exp. Med (2002) 195: 1445) es otro ejemplo de proteínas autotransportadoras, así como siendo un adhesina. Las composiciones inmunogénicas de la invención
 20 pueden por lo tanto incluir combinaciones de NadA y adhesinas en donde NadA contribuye en su capacidad como una proteína autotransportadoras. Estas proteínas pueden derivarse de *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* u otras cepas de *Neisseria*. La invención también incluye otras proteínas autotransportadoras de
 25 *Neisseria*.

Hsf

Hsf tiene una estructura que es común con las proteínas autotransportadoras. Por ejemplo, Hsf de la cepa H44/76 de *N. Meningitidis* consiste de una secuencia de señal hecha de 1-51 aminoácidos, una región principal en al término amino de la proteína madura (aminoácidos 52-479) que está expuesta en la superficie y contiene regiones variables (aminoácidos 52-106, 121-124, 191-210, y 230-234), una región de cuello (aminoácidos 480-509), una región alfa-hélice hidrofóbica (aminoácidos 518-529) y un dominio de anclaje en donde cuatro estructuras de cadena de transmembrana se extienden hacia al membrana exterior (aminoácidos 539-591).

Aunque las Hsf de longitud completa pueden ser utilizadas en las composiciones inmunogénicas de la invención, varios truncados de Hsf y eliminaciones también pueden ser ventajosamente utilizados dependiendo del tipo de vacuna.

Cuando se utiliza Hsf en una vacuna de subunidad, se prefiere utilizar una porción del dominio pasajero soluble; por ejemplo el dominio completo de los aminoácidos 52 a 479, más preferiblemente una proteína conservada del mismo, por ejemplo la secuencia particularmente ventajosa de aminoácidos 134 a 479. Las formas preferidas de Hsf pueden ser truncadas para así eliminar las regiones variables de la proteína descrita en WO 01/55182. Las variantes preferidas podrían incluir la eliminación de una, dos, tres, cuatro o cinco regiones variables como se define en WO 01/55182. Las secuencias anteriores y aquellas descritas más adelante, pueden

ser extendidas o truncadas a través de hasta 1, 3, 5, 7, 10 o 15 aminoácidos en cualquier o ambos términos N o C.

Los fragmentos preferidos de Hsf por lo tanto incluyen la región principal completa de Hsf, preferiblemente conteniendo los aminoácidos 52-473. Los fragmentos preferidos adicionales de Hsf incluyen regiones expuestas en la superficie de la principal incluyendo una o más de las siguientes secuencias de aminoácido: 52-62, 76-93, 116-134, 147-157, 157-175, 199-211, 230-252, 252-270, 284-306, 328-338, 362-391, 408-418, 430-440 y 469-479.

En donde Hsf está presente en una preparación de vesícula de membrana exterior, puede ser expresada como la proteína de longitud completa o preferiblemente como una variante ventajosa hecha de una fusión de los aminoácidos 1-51 y 134-591 (produciendo una proteína de membrana exterior madura de la secuencia de aminoácido 134 al término C). Las formas preferidas de Hsf puede estar truncadas para así eliminar las regiones variables de la proteína descrita en WO 01/55182. Las variantes preferidas podrían incluir la eliminación de una, dos, tres, cuatro o cinco regiones variables como se define en WO 01/55182. Preferiblemente la primera y segunda región variable se elimina. Las variantes preferidas podrían eliminar residuos de entre la secuencia de aminoácido 52 a la 237 o de la 54 a la 237, más preferiblemente eliminar residuos entre el aminoácido 52 al 133 o del 55 al 133. La proteína madura podría carecer del péptido de señal.

Hap

El análisis por computadora de la proteína de tipo Hap de *Neisseria meningitidis* reveló por lo menos tres dominios estructurales. Considerando la secuencia de tipo Hap de la cepa H44/76 como una referencia, el Dominio 1, comprende el aminoácido 1 a 42, codifica un péptido de señal dependiente de sec característico de la familia auto-transportadora, el Dominio 2, comprende los aminoácidos 43 a 950, codifica el dominio pasajero probable de ser expuesto en la superficie y accesible al sistema inmune, el Dominio 3, comprende los residuos 951 al término C (1457), se pronostica que codifica cepas beta que probablemente se ensamblan dentro de la estructura de tipo barril y que van a ser ancladas en la membrana exterior. Dicho dominio 2 será probablemente expuesto en la superficie, bien conservado (más de 80% en todas las cepas probadas) y podría ser producido como antígenos de subunidad en *E. coli*, representa candidatos de vacuna interesantes. Ya que los dominios 2 y 3 probablemente van a estar expuestos en la superficie, están bien conservados (Pizza y otros (2000), Science 287: 1816-1820), representan candidatos de vacuna interesantes. El dominio 2 es conocido como el dominio pasajero.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender la proteína Hap de longitud completa, preferiblemente incorporada dentro de una preparación OVM. Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender el domino pasajero de Hap el cual en la cepa H44/76 está compuesto

de los residuos de aminoácido 43-950. Este fragmento de HAP podría ser particularmente ventajosamente utilizado en una composición de subunidad de la invención. La secuencia anterior para el dominio pasajero de Hap puede extenderse o truncarse a través de hasta 1,
 5 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos en cualquiera o ambos términos N o C.

3. *Proteínas de adquisición de Hierro*

Las proteínas de adquisición de hierro incluyen TbpA (NMB
 10 0461) (W092/03467, US5912336, W093/06861 y EP586266), TbpB (NMB 0460)(W093/06861 y EP586266), LbpA (NMB 1540) (Med Microbiol (1999) 32: 1117), LbpB (NMB 1541) (WO/99/09176), HpuA(U73112.2) (Mol Microbiol. 1997,23; 737-749), HpuB (NC_003116. 1) (Mol Microbiol. 1997,23 ;737-749), P2086 también
 15 conocida como XthA (NMB 0399) (13^{avo} International Pathogenic Neisseria Conference 2002), FbpA (NMB 0634), FbpB, BfrA (NMB 1207), BfrB (NMB 1206), Lipo28 también conocida como GNA2132 (NMB 2132), Sibp (NMB 1882), HmbR, HemH, Bcp (NMB 0750), proteína de permeasa transportadora ABC de Hierro(III) (Tettelin y
 20 otros, Science 287; 1809-1815 2000), transportadora-periplásmica ABC de Hierro(III) (Tettelin et al Science 287; 1809-1815 2000), receptor dependiente de TonB (NMB 0964 y NMB 0293) (Tettelin otros, Science 287 ; 1809-1815 2000) proteína relacionada con proteína de unión a transferina (Tettelin y otros, Science 287;1809-
 25 1815 2000). Estas proteínas pueden derivarse de *Neisseria*

meningitidis, *Neisseria gonorrhoeae*, y otras cepas *Neisseria*. La invención también incluye otras proteínas de adquisición de hierro de *Neisseria*.

5 TbpA

TbpA interactúa con TbpB para formar un complejo de proteína en la membrana exterior de *Neisseria*, la cual se une a transferina. Estructuralmente, TbpA contiene un dominio N-terminal intracelular con una caja TonB y dominio promotor, cepas beta de transmembrana
10 múltiples enlazadas a través de un bucle intracelular corto y extracelular más largo.

Se han distinguido dos familias de TbpB, que tienen un peso molecular alto y un peso molecular bajo respectivamente. Las formas de peso molecular alto y bajo de TbpB se asocian con diferentes
15 familias de TbpA que son distinguibles sobre la bases de homología. A pesar del peso molecular similar, son conocidas como las familias de peso molecular alto y peso molecular bajo debido a su asociación con la forma de peso molecular alto bajo de TbpB (Rokbi y otros, FEMS Microbiol. Lett. 100; 51, 1993). Los términos TbpA(alto) y
20 TbpA(bajo) se utilizan para referirse a estas dos formas de TbpA, y similarmente para TbpB. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender TbpA y TbpB de los serogrupos A, B, C, Y y W-135 de *N. meningitidis* así como proteínas de adquisición de hierro de otras bacterias incluyendo *N. gonorrhoeae*. Las
25 proteínas de unión a transferina TbpA y TbpB también han sido

referidas como Tbp1 y Tbp2 respectivamente (Cornelissen y otros Infection and Immunity 65; 822, 1997).

TbpA contiene varias regiones distintas. Por ejemplo, en el caso de TbpA de la cepa H44/76 de *N. meningitidis*, los 186 aminoácidos del término amino forman un dominio globular interno, 22 cepas beta se extienden en la membrana, formando una estructura de barril beta. Estas están enlazadas a través de bucles intracelulares cortos y bucles extracelulares largos. Los bucles extracelulares 2, 3, y 5 tiene el grado más alto de variabilidad de secuencia y el bucle 5 está expuesto en la superficie. Los bucles 5 y 4 están involucrados en la unión a ligando.

Los fragmentos preferidos de TbpA incluyen los bucles extracelulares de TbpA. Al utilizar la secuencia de TbpA de la cepa H44/76 de *N. meningitidis*, estos bucles corresponden a los aminoácidos 200-202 del bucle 1, los aminoácidos 226-303 del bucle 2, los aminoácidos 348-395 del bucle 3, los aminoácidos 438-471 del bucle 4, los aminoácidos 512-576 del bucle 5, los aminoácidos 609-625 del bucle 6, los aminoácidos 661-671 del bucle 7, los aminoácidos 707-723 del bucle 8, los aminoácidos 769-790 del bucle 9, los aminoácidos 814-844 del bucle 10 y los aminoácidos 872-903 del bucle 11. Las secuencias correspondientes, después de la alineación de secuencia, en otras proteínas Tbp también podrían constituir fragmentos preferidos. Los fragmentos más preferidos podrían incluir las secuencias de aminoácido que constituyen el bucle 2, el bucle 3, el bucle 4, o el bucle 5 de Tbp.

Cuando las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden TbpA, es preferible incluir ambos TbpA(alto) y TbpA(bajo).

Aunque TbpA preferiblemente se presenta en la vacuna OMV, también puede ser parte de una vacuna de subunidad. Por ejemplo, las proteínas de adquisición de hierro que podrían ser introducidas en una composición inmunogénica de la invención son bien conocidas en la técnica (WO 00/25811). Estas pueden ser expresadas en un huésped bacteriano, extraídas utilizando detergente (por ejemplo 2% de Elugent) y purificadas a través de cromatografía de afinidad o utilizando técnicas de cromatografía de columna estándares bien conocidas en la técnica (Oakhill y otros, Biochem J. 2002 363; 613-6).

Cuando TbpA está presente en una vacuna OMV, su expresión puede ser regulada de manera ascendente a través de técnicas genéticas discutidas aquí, o puede preferiblemente ser regulada de manera ascendente a través del crecimiento de la cepa padre bajo condiciones de limitación de hierro como se describe más adelante. Este proceso también dará como resultado la regulación ascendente de las proteínas reguladas en hierro, particularmente FrpB, la cual se convierte en inmunodominante y es por consiguiente ventajosa para regular de manera descendente la expresión de (y preferiblemente eliminar los genes que codifican) dichas proteínas (particularmente FrpB) como se describe más adelante, para asegurar que la composición inmunogénica de la invención provoca

una respuesta inmune contra los antígenos presentes en un amplio rango de cepas Neisserial. Se prefiere tener ambas, TpbA(alta) y TpbA(baja) presentes en la composición inmunogénica y es preferible lograrlo a través de la combinación de OMVs derivados de dos
5 cepas, que expresan las formas alternativas de TpbA.

4. Toxinas

Las toxinas incluyen FrpA (NMB 0585; NMB 1405), FrpA/C (ver definición a continuación), FrpC (NMB 1415; NMB 1405)
10 (W092/01460), NM-ADPRT (NMB 1343) (13^{avo} International Pathogenic Neisseria Conference 2002 Massignani y otros p 135), VapD (NMB 1753), lipopolisacárido (LPS; también llamado lipooligosacárido LOS) inmunotipo L2 y inmunotipo L3. LPS FrpA y FrpC contienen una región que está conservada entre estas dos
15 proteínas y un fragmento preferido de las proteínas podría ser un polipéptido que contiene este fragmento conservado, preferiblemente comprendiendo los aminoácidos 227-1004 de la secuencia FrpA/C. Estos antígenos puede derivarse de *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* y otras cepas Neisseria. La invención también
20 incluye otras toxinas de Neisseria. En una modalidad alternativa, las toxinas pueden incluir antígenos involucrado en la regulación de la toxicidad, por ejemplo OstA el cual funciona en la síntesis de lipopolisacáridos.

FrpA y FrpC

Neisseria meningitidis codifica dos proteínas RTX, referidas como FrpA y FrpC secretadas dependiendo de la limitación del hierro (Thompson y otros, (1993) J. Bacteriol. 175: 811-818; Thompson y
5 otros, (1993) Infect. Immun. 61: 2906-2911). La familia de proteínas RTX (Repetición de ToXin) que tiene en común series de 9 repeticiones de aminoácido cerca del término C con el consenso: Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly (Asn/Asp) Asp Xaa.

(LXGGXGN/DX). Las repeticiones en *E. coli* HlyA se cree que
10 son el sitio de unión Ca^{2+} . Como se representa en la Figura 4, las proteínas meningocócicas FrpA y FrpC, como se caracterizan en la cepa FAM20, comparten una extensiva similitud de aminoácido en sus regiones central y C-terminal pero una similitud muy limitada (si hay alguna) en el término N. Además, las región conservada entre
15 FrpA y FrpC exhiben algo de polimorfismo debido a la repetición (13 veces en FrpA y 43 veces en FrpC) de un motivo del aminoácido 9.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender la FrpA y/o FrpC de longitud completa o preferiblemente, un fragmento que comprende la secuencia conservada entre FrpA y
20 FrpC. La secuencia conservada está formada de unidades de repetición de 9 aminoácidos. Las composiciones inmunogénicas de la invención preferiblemente comprenderán más de tres repeticiones, más de 10 repeticiones, más de 13 repeticiones, más de 20 repeticiones o más de 23 repeticiones.

25 Dichos truncados tienen propiedades ventajosas sobre las

moléculas de longitud completa y vacunas que comprenden dichos antígenos de un aspecto independiente de la invención tal como se venden como estando incorporados en las composiciones inmunogénicas de la invención.

- 5 Las secuencias conservadas entre FrpA y FrpC se designan FrpA/C y donde quiera que FrpA y FrpC formen un constituyente de las composiciones inmunogénicas de la invención, FrpA/C podrá ser ventajosamente utilizada. Los aminoácidos 277-1004 de la secuencia FrpA es la región conservada preferida. Las secuencias anteriores
10 pueden extenderse o truncarse por hasta 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos en cualquiera o ambos términos N o C.

LPS

- LPS (lipopolisacárido, también conocido como LOS -
15 lipooligosacárido) es la endotoxina en la membrana exterior de Neisseria. La porción de polisacárido de LPS se sabe que induce anticuerpos bacterianos.

- La heterogeneidad entre la porción del oligosacárido de LPS genera una diversidad estructural y antigénica entre las diferentes
20 cepas neisserial (Griffiss y otros Inf. Immun. 1987; 55: 1792-1800). Esta se ha utilizado para subdividir cepas meningocócicas en 12 inmutipos (Scholtan y otros J Med Microbiol 1994, 41: 236-243). Los inmutipos L3, L7 y L9 son inmunológicamente idénticos y son estructuralmente similares (o aún el mismo) y por lo tanto han sido
25 designados L3,7,9 (o, para los propósitos de esta especificación,

genéricamente como "L3"). El LPS meningocócico L3,7,9 (L3), L2 y L5 pueden ser modificados a través de sialilación, o a través de la adición de ácido 5'-monofosfato-N-acetilneuramínico de citidina. Aunque los LPS L2, L4 L6 son inmunológicamente distinguibles, son estructuralmente similares dentro del alcance de la invención. Ver M.P. Jennings y otros, *Microbiology* 1999, 145, 3013-3021 y Mol Microbiol 2002, 43:931-43 para una ilustración adicional de la estructura y heterogenicidad de LPS.

Cuando se incluye LPS, preferiblemente LPS meningocócico en una vacuna de la invención, preferiblemente y ventajosamente cualquiera o ambos de los inmutipos L2 y L3 están presentes. LPS está preferiblemente presente en la vesícula de la membrana exterior (preferiblemente cuando la vesícula se extrae con un bajo porcentaje de detergente, más preferiblemente 0-0.5%, 0.02-0.4%, 0.04-0.3%, 0.06-0.2%, 0.08-0.15% o 0.1%, más preferiblemente deoxicolato [DOC] pero también puede ser parte de una vacuna de subunidad. LPS puede ser aislado utilizando procedimientos bien conocidos incluyendo el procedimiento de agua caliente-fenol (Wesphal y Jann Meth. Carbo. Chem. 5; 83-91 1965). Ver también Galanos y otros 1969, *Eur J Biochem* 9: 245-249, y Wu y otros 1987, *Anal Bio Chem* 160: 281-289. LPS puede ser utilizado claro o conjugado a una fuente de epítopos de célula T como anatoxina de tétano, anatoxina de difteria, CRM-197 o proteínas de membrana exterior OMV. Las técnicas para conjugar LOS aislados también son conocidas (ver por ejemplo EP 941738 incorporada aquí por referencia).

Cuando LOS (en particular los LOS de la invención) están presentes en una formulación de ampolla los LOS están preferiblemente conjugados *in situ* a través de métodos que permiten la conjugación de LOS con una o más proteínas de membrana exteriores también presentes en la preparación de la ampolla (por ejemplo, PorA o PorB en meningococos).

Este proceso puede ventajosamente mejorar la estabilidad y/o inmunogeneicidad (proporcionando ayuda de célula T) y/o antigeneicidad del antígeno LOS dentro de la formulación de ampolla, de esta manera dando ayuda de célula T para el inmunógeno de oligosacárido independiente de T en su conformación más protectora, según LOS en su ambiente natural en la superficie de la membrana exterior meningocócica. Además, la conjugación de LOS dentro de la ampolla puede dar como resultado una desintoxicación de LOS (la porción A del lípido siendo establemente enterrada en la membrana exterior y de esta forma estando menos disponible para causar toxicidad). De esta forma los métodos de desintoxicación mencionados aquí de aislamiento de ampollas de mutantes *htrB⁻* o *msbB⁻*, o a través de la adición de un equivalente funcional de péptido no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad al Lípido A] a la composición (ver WO 93/14115, WO 95/03327, Velucchi y otros (1997) J Endotoxin Res 4: 1-12, y EP 976402 para detalles adicionales de equivalentes de péptido funcional no tóxicos, de polimixina B, particularmente el uso, del péptido SAEP 2 (de la secuencia KTKCKFLKKC en donde 2 cisteínas

forman un puente de disulfuro)) pueden no ser requeridos (pero los cuales pueden ser agregados en combinación para una seguridad adicional). De esta forma los inventores han encontrado que una composición que comprende ampollas en donde LOS está presente en las ampollas ha sido conjugada en una forma intra-ampolla con las proteínas de la membrana exterior también presentes en la ampolla pueden formar las bases de una vacuna para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por el organismo a partir del cual las ampollas han sido derivadas, en donde dicha vacuna es substancialmente no tóxica y es capaz de inducir una respuesta bactericida dependiente de T contra LOS en su ambiente nativo.

La invención por consiguiente además proporciona dicha preparación de ampollas meningocócicas conjugadas de LOS intra-ampollas.

Dicha preparación de ampollas puede ser aislada de la bacteria en cuestión (ver WO 01/09350) y después sometida a químicas de conjugación conocidas para enlazar grupos (por ejemplo NH_2 o COOH) en la porción del oligosacárido de LOS a grupos (por ejemplo, NH_2 o COOH) en las proteínas de la membrana exterior de la ampolla. Las técnicas de entrelazamiento utilizando glutaraldehído, formaldehído, o mezclas de glutaraldehído/formaldehído pueden ser utilizadas, pero se prefiere que se utilicen químicas más selectivas tales como EDAC o EDAC/NHS (J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Mejoramiento a través de N-hidroxisuccinima de reacciones de acoplamiento

mediadas por carbodiimida soluble en agua. Química Analítica 156: 220-222 (1986); y Técnicas de Bioconjugados. Greg T. Hermanson (1996) pp 173-176). Otras químicas de conjugación o tratamientos capaces de crear enlaces covalentes entre LOS y moléculas de proteína que podrían ser utilizadas se describen en EP 941738.

Preferiblemente las preparaciones de ampolla se conjugan en ausencia del polisacárido capsular. Las ampollas pueden aislarse de una cepa que no produce polisacárido capsular (naturalmente o a través de mutación como se describe más adelante), o puede ser purificada a partir de la mayoría y preferiblemente de todos los polisacáridos capsulares contaminantes. En esta forma, la reacción de conjugación LOS de intra-ampollas es mucho más eficiente.

Preferiblemente más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 79, 80, 90, o 95% de los LOS presentes en las ampollas son entrelazados/conjugados.

La conjugación intra-ampolla deberá preferiblemente incorporar 1, 2 o los tres de los siguientes pasos del proceso: la conjugación del pH deberá ser mayor de pH 7.0, preferiblemente mayor de o igual a un pH de 7.5 (más preferiblemente bajo un pH 9); condiciones de 1-5% preferiblemente 2-4% más preferiblemente alrededor de 3% de sacarosa deberán ser mantenidas durante la reacción; el NaCl deberá ser minimizado en la reacción de conjugación, preferiblemente por debajo de 0.1M, 0.05M, 0.01M, 0.005M, 0.001M, y más preferiblemente no estar presente para nada. Todas estas características del proceso aseguran que las ampollas permanezcan

estables y en solución a lo largo del proceso de conjugación.

El proceso de conjugación EDAC/NHS es un proceso preferido para conjugación intra-ampolla. EDAC/NHS es preferido para formaldehído el cual puede entrelazarse a muy alto grado, de esta forma adversamente afecta la capacidad de filtración, EDAC reacciona con ácidos carboxílicos (tales como KDO en LOS) para crear un intermediario de éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina (tales como lisinas en las proteínas de membrana exterior tal como PorB), se forma un enlace de amida con liberación de una isourea por producto. Sin embargo, la eficiencia de una reacción mediada por EDAC puede ser incrementada a través de la formación de un intermediario de éster Sulfo-NHS. El éster Sulfo-NHS sobrevive en una solución acuosa más tiempo que el éster activo formado de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De esta forma, se pueden realizar rendimientos más altos de formación de enlaces de amida utilizando este proceso de dos etapas. La conjugación EDAD/NHS se discute en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. El mejoramiento a través de N-hidroxisuccinimida de reacciones acopladas mediadas por carbodiimida soluble en agua. Química analítica 156: 220-222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173-176. Preferiblemente se utilizan ampollas de 0.01-5 mg de EDAC/mg en la reacción, más preferiblemente una ampolla de 0.05-1 mg EDAC/mg. La cantidad de EDAC utilizada depende de la cantidad de LOS presente en la muestra la cual a su vez depende del % de desoxicolato (DOC)

utilizado para extraer las ampollas. A un % de DOC bajo (por ejemplo, 0.1%), se utilizan cantidades más altas de EDAC (1 mg/mg y más), sin embargo a un % más alto de DOC (por ejemplo, 0.5%), se utilizan cantidades menores de EDAC (0.025-0.1 mg/mg) para evitar
5 muchos entrelazamiento inter-ampolla.

Un proceso preferido de la invención es por consiguiente un proceso para producir LOS conjugados intra-ampolla (preferiblemente meningocócicos) que comprenden los pasos de conjugación de las ampollas en presencia de EDAC/NHS a un pH de entre 7.0 y un pH
10 de 9.0 (preferiblemente alrededor de un pH de 7.5), en 1-5% (preferiblemente alrededor de 3%) de sacarosa, y opcionalmente en condiciones que substancialmente carecen de NaCl (como se describió anteriormente), y aislando las ampollas conjugadas de la mezcla de reacción.

15 La reacción puede ser seguida en geles de separación Western de la mezcla de reacción utilizando mAbs anti-LOS (por ejemplo, anti-L2 o anti-L3) para mostrar el incremento del peso molecular de LOS para una proporción mayor de los LOS en las ampollas a medida que el tiempo de reacción transcurre.

20 Utilizando dichas técnicas se pueden recuperar rendimientos del 99% de las ampollas.

Se encontró que EDC es un excelente agente de entrelazamiento intra-ampolla, ya que entrelaza LOS a OMP suficientemente para una inmunogenicidad dependiente de T de LOS
25 mejorada, pero no se entrelaza a él a un alto grado que pueden

ocurrir problemas tales como capacidad de filtración, agregación y entrelazamiento intra-ampolla. La morfología de las ampollas generadas es similar a aquella de ampollas no conjugadas (a través de microscopio electrónico). Además, el protocolo anterior evitó que
5 se presentara un entrelazamiento demasiado alto (el cual puede reducir la inmunogenicidad de OMPs protectores presentes sobre la superficie de la ampolla, por ejemplo TbpA o Hsf).

Se prefiere que la cepa meningocócica de la cual se derivan las ampollas sea una cepa mutante que no puede producir el
10 polisacárido capsular (por ejemplo, una de las cepas mutantes descritas anteriormente, en particular *siaD*⁻). También se prefiere que las composiciones inmunogénicas efectivas contra la enfermedad meningocócica comprendan ambas, una ampolla L2 y una L3, en donde las LOS L2 y L3 ambas se conjugan con las proteínas de
15 membrana exterior. Además, se prefiere que la estructura de LOS dentro de la ampolla conjugada intra-ampolla sea consistente con ésta habiendo sido derivada de una cepa meningocócica *lgtB*⁻ (como se describe más adelante). Más preferiblemente las composiciones inmunogénicas comprenden ampollas intra-ampolla-conjugadas:
20 derivadas de una cepa meningocócica mutante que no puede producir el polisacárido capsular y es *lgtB*⁻; comprendiendo ampollas L2 y L3 derivadas de las cepas meningocócicas mutantes que no pueden producir el polisacárido capsular; comprendiendo ampollas L2 y L3 derivadas de las cepas meningocócicas mutantes que son
25 *lgtB*⁻; o más preferiblemente comprendiendo ampollas L2 y L3

derivadas de las cepas meningocócicas mutantes que no pueden producir el polisacárido capsular y que son lgtB⁻.

La cepa meningocócica L3 típica que pueden ser utilizada para la presente invención es la cepa menB H44/76. Un cepa L2 típica es
5 la cepa menú B16B6 o la cepa de tipo C meningocócica 39E.

Como se manifestó anteriormente, las ampollas de la invención han sido desintoxicadas a un grado a través de la acción de la conjugación, y no necesitan ser desintoxicadas adicionalmente, sin embargo los métodos de desintoxicación adicionales pueden
10 utilizarse para una seguridad adicional, por ejemplo utilizando ampollas derivadas de una cepa meningocócica que es htrB⁻ o msbB⁻ o agregando un equivalente funcional de péptido no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad al Lípido A] (preferiblemente SEAP 2) a la composición de la ampolla (como se
15 describió anteriormente).

En la forma anterior, las ampollas meningocócica y las composiciones inmunogénicas que comprenden ampollas son provistas, las cuales tienen como un antígeno importante LOS, el cual es substancialmente no tóxico, carece de problemas de
20 autoinmunidad, tiene un carácter dependiente de T, está presente en su ambiente natural, y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo bactericida contra más de 90% de las cepas meningocócicas (en el caso de composiciones L2+L3).

Preferiblemente la conjugación LOS intra-ampolla deberá
25 incorporar 1, 2, o los 3 siguientes pasos del proceso: la conjugación

del pH deberá ser mayor de un pH 7.0, preferiblemente mayor o igual a un pH de 7.5 (más preferiblemente un pH por debajo de 9); se deberán mantener condiciones de 1-5%, preferiblemente 2-4%, más preferiblemente alrededor de 3% de sacarosa durante la reacción:

5 NaCl deberá ser minimizado en la reacción de conjugación, preferiblemente por debajo de 0.1M, 0.05M, 0.01M, 0.005M, 0.001M, y más preferiblemente no estar presente para nada. Todas estas características del proceso aseguran que las ampollas permanezcan estables y en solución a lo largo del proceso de conjugación.

10 Aunque LOS puede ser conjugado dentro de las ampollas a proteínas de membrana exterior a través de varias técnicas y químicas, el proceso de conjugación EDAC/NHS es un proceso preferido para la conjugación intra-ampolla. EDAC/NHS es preferido para formaldehído, el cual puede entrelazarse a un alto grado, de

15 esta forma adversamente afecta la calidad de filtración. EDAC reacciona con ácidos carboxílicos para crear un intermediario de éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina, se forma un enlace de amida con liberación de una isourea por producto. Sin embargo, la eficiencia de una reacción mediada por EDAC puede ser

20 incrementada a través de la formación de un intermediario de éster Sulfo-NHS. El éster Sulfo-NHS sobrevive en una solución acuosa más tiempo que el éster activo formado de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De esta forma, se pueden realizar rendimientos más altos de formación de enlaces de amida utilizando este proceso

25 de dos etapas. La conjugación EDAD/NHS se discute en J. V. Staros,

R. W. Wright y D. M. Swingle. El mejoramiento a través de N-hidroxisuccinimida de reacciones de acoplamiento mediadas por carbodiimida soluble en agua. Química analítica 156: 220-222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 5 173-176.

Un proceso preferido de la invención es por consiguiente un proceso para la producción de LOS conjugado intra-ampolla (preferiblemente meningocócica) que comprende los pasos de conjugar ampollas en presencia de EDAC/NHS a un pH de entre 7.0 y 10 un pH de 9.0 (preferiblemente alrededor de un pH de 7.5), en 1-5% (preferiblemente alrededor de 3%) de sacarosa, y opcionalmente en condiciones que substancialmente carecen de NaCl (como se describió anteriormente), y aislando las ampollas conjugadas de la mezcla de reacción.

15 Después de la reacción debe seguir la separación de geles de la mezcla de reacción utilizando mAbs anti-LOS (por ejemplo, anti-L2 o anti-L3) para mostrar el incremento del peso molecular de LOS para una proporción mayor de LOS en las ampollas cuando pasa el tiempo de reacción.

20 Los rendimientos de 99% de ampollas pueden ser recuperados utilizando dichas técnicas. EDAC se encontró que es un agente de entrelazamiento de intra-ampollas excelente en que entrelaza LOS a OMP suficientemente para mejorar la inmunogeneicidad dependiente de T de LOS, pero no se entrelaza a dicho alto grado que puedan 25 ocurrir problemas tales como una pobre capacidad de filtración y

entrelazamiento inter-ampolla. Un entrelazamiento muy alto también deberá evitarse para evitar cualquier disminución en la inmunogeneicidad de las OMPs protectoras naturalmente presentes en la superficie de la ampolla, por ejemplo, TbpA.

5

5. *Proteínas de membrana exterior integrales*

Otras categorías de proteínas Neisserial también pueden ser candidatas para la inclusión en las vacunas Neisserial de la invención y pueden ser capaces de combinarse con otros antígenos en una forma sorprendentemente efectiva. Las proteínas asociadas de membrana, particularmente proteínas de membrana integral y más ventajosamente proteínas de membrana exterior, especialmente proteínas de membrana exterior integral pueden ser utilizadas en las composiciones de la presente invención. Un ejemplo de dichas proteínas es P1dA también conocida como Omp1A (NMB 0464) (WO 00/15801), la cual es una proteína de membrana exterior de fosfolipasa Neisserial. Ejemplos adicionales son TspA (NMB 0341) (Infect. Immun. 1999, 67; 3533-3541) y TspB (proteína que estimula la célula T) (WO 00/03003; NMB 1548, NMB1628 o NMB 1747). Los ejemplos adicionales incluyen PilQ (NMB 1812) (W099/61620), OMP85 – también conocida como D15- (NMB0182) (WO00/23593), NspA (U52066) (W096/29412), FhaC (NMB 0496 o NMB 1780), PorB (NMB 2039) (Mol. Biol. Evol. 12; 363-370, 1995), HpuB (NC_003116.1), TdfH (NMB 1497) (Microbiology 2001, 147; 1277-1290), OstA (NMB0280), MltA también conocida como GNA33 y Lipo30

20

25

(NMB0033), HtrA (NMB 0532; WO 99/55872), HimD (NMB 1302), HisD (NMB 1581), GNA 1870 (NMB 1870), HlpA (NMB 1946), NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, TbpA (NMB 0461) (W092/03467) (ver también bajo proteínas de adquisición de hierro) y

5 LbpA (NMB 1541).

OMP85

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender la OMP85 de longitud completa, preferiblemente como

10 parte de una preparación OMV. Los fragmentos de OMP85 también se pueden utilizar en composiciones inmunogénicas de la invención, especialmente, el dominio expuesto en la superficie de OMP85 hecho de los residuos de aminoácido 1-475 o 50-475 está preferiblemente incorporado dentro de un componente de subunidad de las

15 composiciones inmunogénicas de la invención. La secuencia anterior para el dominio expuesto en la superficie de OMP85 puede ser extendido o truncado por hasta 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, o 30 aminoácidos en cualquiera o ambos de los términos N o C. Se prefiere que la secuencia de señal sea omitida del fragmento OMP85.

20

OstA

OstA funciona en la síntesis de lipopolisacáridos y puede ser considerada como siendo un regulador de toxicidad. OstA puede

alternativamente ser incluida en la categoría de toxinas en donde la

25 categoría de toxina se amplía para contener reguladores de toxicidad

así como toxinas.

Composiciones inmunogénicas

Una composición inmunogénica es una composición que
5 comprende por lo menos un antígeno que es capaz de generar una
respuesta inmune cuando se administra a un huésped.
Preferiblemente, dichas preparaciones inmunogénicas son capaces
de generar una respuesta inmune protectora contra *Neisserial*,
preferiblemente infección por *Neisserial meningitidis* o *Neisserial*
10 *gonorrhoeae*.

La invención se refiere a composiciones inmunogénicas que
comprenden por lo menos dos antígenos, las cuales preferiblemente
provocan una o más de una respuesta bactericida sinérgica,
protectora o de bloqueo de adhesión.

15

Ensayos bactericidas SBA de la invención

Dicha respuesta sinérgica puede estar caracterizada por el
SBA provocado por la combinación de antígenos siendo de por lo
menos 50%, dos veces, tres veces, preferiblemente cuatro veces,
20 cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces y más
preferiblemente diez veces mayor que el SBA provocado por cada
antígeno separadamente. Preferiblemente SBA se mide contra una
cepa homóloga a partir de la cual se derivan los antígenos y
preferiblemente también contra un panel de cepas heterólogas. (Ver
25 a continuación un panel representativo por ejemplo BZ19 (B:2b:P1.2)

perteneciente al grupo A-4, B16B6 (B: 2a: P1. 2) perteneciente al complejo ET-37; y H44/76 (B: 15 : P1. 7,16)). SBA es el marcador inmunológico más comúnmente acordado para estimar la eficacia de una vacuna meningocócica (Perkins y otros, J Infect Dis. 1998, 177:683-691). Satisfactoriamente SBA puede ser constatado por cualquier método conocido. SBA puede ser llevado a cabo utilizando suero obtenido de modelos de animales (ver ejemplos 17-20), o de sujetos seres humanos.

Un método preferido para conducir SBA con suero de seres humanos es el siguiente. Una muestra de sangre se toma antes de la primera vacunación, dos meses después de la segunda vacunación y un mes después de la tercera vacunación (tres vacunaciones en un año siendo un agenda una vacunación primaria humana típica administrada en los 0, 2, y 4 meses, o 0, 1, y 6 meses). Dichas agendas de vacunación primaria humana pueden ser llevadas a cabo en infantes de menos de 1 año de edad (por ejemplo al mismo tiempo que se llevan a cabo las vacunaciones Hib) o de 2-4 años de edad o los adolescentes también pueden ser vacunados para la prueba SBA con dicha agenda de vacunación primaria. Se puede tomar una segunda muestra de sangre a los 6 a 12 meses después de la primera vacunación y un mes después de una dosis de defensa, si es aplicable.

SBA será satisfactoria para una preparación de antígeno o de ampolla con actividad bactericida homóloga si un mes después de la tercera dosis de vacunación (de la agenda de la vacunación primaria)

(en infantes de 2-4 años de edad, o adolescentes, pero preferiblemente en infantes en el primer año de vida) el porcentaje de sujetos con un incremento de cuatro veces en términos de concentración de SBA (dilución del anticuerpo) (comparado con la
5 concentración de la pre-vacunación) contra la cepa de meningococos a partir de la cual los antígenos de la invención se derivan, es mayor que 30%, preferiblemente mayor que 40%, más preferiblemente mayor que 50%, y de preferencia mayor que 60% de los sujetos.

Por supuesto una preparación de antígeno o ampolla con
10 actividad bactericida heteróloga también puede constituir la preparación de ampolla con actividad bactericida homóloga si también puede provocar un SBA satisfactorio contra la cepa meningocócica a partir de la cual se deriva.

SBA será satisfactoria para una preparación de antígeno o
15 ampolla con actividad bactericida heteróloga si uno mes después de la tercera dosis de vacuna (o de la agenda de vacunación primaria) (en infantes de 2-4 años de edad, o adolescentes, pero preferiblemente en infantes en el primer año de vida) el porcentaje de sujetos con un incremento de cuatro veces en términos de
20 concentración de SBA (dilución del anticuerpo) (comparado con la concentración de la pre-vacunación) contra tres cepas heterólogas de meningococo es mayor que 20%, preferiblemente mayor que 30%, más preferiblemente mayor que 35%, y de preferencia mayor del 40% de los sujetos. Dicha prueba es una buena indicación de si la
25 preparación de antígeno o ampolla con actividad bactericida

heteróloga puede inducir anticuerpos bactericidas cruzados contra varias cepas meningocócicas. Las tres cepas heterólogas deberán preferiblemente tener un complejo de tipo (ET) o un patrón de inserción de secuencia multi-sitio (MLST) (ver Maiden y otros, PNAS 5 EUA 1998, 95:3140-5) una con la otra y preferiblemente la cepa a partir de la cual la preparación de antígeno o ampolla con actividad bactericida heteróloga se forma o se deriva. Una persona con experiencia fácilmente será capaz de determinar tres cepas con diferentes completos ET que reflejan la diversidad genética 10 observada entre meningocócica, particularmente cepas de tipo B meningocócicas que son reconocidas como siendo la causa de una carga de enfermedades importante y/o que representan linajes hipervirulentos de MenB (ver, Maiden y otros, *supra*). Por ejemplo, tres cepas que podrían ser utilizadas son las siguientes: BZ10 (B:2b:P1. 15 2) que pertenecen al grupo A-4; B16B6 (B:2a:P1.2) que pertenecen al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7,16) que pertenecen al complejo ET-5, o cualesquiera otras cepas que pertenecen al mismo grupo ET. Dichas cepas pueden ser utilizadas para probar una preparación de antígeno o ampolla con actividad bactericida heteróloga hecha o 20 derivada de, por ejemplo, la cepa meningocócica CU385 (B:4:P1.15) la cual pertenece al complejo ET-5. Otra cepa de muestra que podría ser utilizada es del clon epidémico del Linaje 3 (por ejemplo, NZ124 [B:4:P1.7,4]). Otra cepa ET-37 es NGP165 (B:2a:P1.2).

Los procesos para medir la actividad SBA son conocidos en la 25 técnica. Por ejemplo un método que podría ser utilizado se describe

en WO 99/09176 en el Ejemplo 10C. En términos generales, un cultivo de una cepa que va a ser probada se hace crecer (preferiblemente en condiciones de reducción de hierro, a través de la adición de un quelatador de hierro tal como EDDA al medio de crecimiento) en una fase de registro de crecimiento. Esto se puede suspender en un medio con BSA (tal como el medio Hanks con 0.3% de BSA) con el fin de obtener una suspensión de célula trabajando ajustada a aproximadamente 20000 CFU/ml. Se pueden hacer series de mezclas de reacción mezclando series de diluciones dobles del suero que se va a probar (preferiblemente inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos) [por ejemplo en un volumen de 50 µl/cavidad]. Los frascos de reacción deberán ser incubados (por ejemplo 37°C durante 15 minutos) y agitarse (por ejemplo a 210 rpm). La mezcla de reacción final [por ejemplo en un volumen de 100 µl] adicionalmente contiene una fuente de complemento [tal como un volumen final de 25% del suero de conejo bebé preprobado] y se incuba como anteriormente [por ejemplo, 37°C durante 69 minutos]. Se puede utilizar una placa de microtitulación de 96 cavidades de fondo en forma de U de poliestireno estéril para este ensayo. Se puede tomar una alícuota [por ejemplo, 10 µl] de cada cavidad utilizando una pipeta multicanal, y se deja caer dentro de placas de agar Mueller-Hinton (preferiblemente conteniendo 1% de Isovitalex y 1% de Suero de Caballo inactivado por calor), y se incuba (durante por ejemplo 18 horas a 37°C en 5% de CO₂). Preferiblemente, las colonias individuales pueden contarse hasta 80 CFU por alícuota.

Las siguientes tres muestras de prueba pueden ser utilizadas como controles: regulador de pH+bacteria+complemento; regulador de pH+bacteria+complemento inactivado; suero+bacteria+complemento inactivado. Las concentraciones de SBA pueden ser fácilmente
5 calculadas utilizando un programa que procese datos para dar una medición de la dilución que corresponde a 50% de la aniquilación de células a través de un cálculo de regresión.

Ensayos de protección de animales

10 Alternativamente, la respuesta sinérgica puede estar caracterizada por la eficacia de la combinación de antígenos en ensayos de protección de animales. Por ejemplo, los ensayos descritos en el Ejemplo 12 o 13 pueden ser utilizados. Preferiblemente el número de animales protegidos por la
15 combinación de antígenos es significativamente mejorado comparado con el uso de antígenos por sí solos, particularmente en dosis subóptimas de antígeno.

Una vacuna exitosa para la prevención de infección por *N. gono* puede requerir más de uno de los siguientes elementos: generación
20 de suero y/o anticuerpos mucosos para facilitar la aniquilación mediada por complemento de los gonococos, y/o para mejorar la fagocitosis y aniquilación microbiana a través de leucocitos tales como leucocitos polimorfonucleares, y/o prevenir la adhesión del gonococo a los tejidos del huésped; la inducción de la respuesta
25 inmune mediada por célula también puede participar en la

protección.

El mejoramiento de la eficacia de una preparación de vacuna de gono de ampolla de la invención puede ser evaluada analizando la respuesta inmune inducida por suero y/o anticuerpos de la mucosa que tienen antiadherencia, y/o propiedades formadoras de proteína, y/o actividad bactericida, como se describe por otros (McChesney D y otros, Infect. Immun. 36: 1006, 1982 ; Boslego J y otros: Efficacy trial of a purified gonococci pilus vaccine, in Program and Abstracts of the 24^{ava} Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, American Society for Microbiology, 1984; Siegel M y otros, J. Infect. Dis 145: 300, 1982; de la Pas, Microbiology, 141 (Pt4): 913-20, 1995).

Un modelo de ratón de infección genital a través de *N. gono* ha sido recientemente descrito (Plante M, J. Infect. Dis., 182 :848-55, 2000). El mejoramiento de eficiencia de una vacuna de gono de ampolla de la invención también podría ser evaluada por su habilidad para prevenir o para reducir la colonización a través de *N. gono* en este modelo de ratón de infección.

20 *Ensayo de bloqueo de adhesión*

Alternativamente, la respuesta sinérgica puede ser caracterizadas por la eficacia de la combinación de antígenos en un ensayo de bloqueo de adhesión. Por ejemplo, el ensayo descrito en el ejemplo 11 puede ser utilizado. Preferiblemente, la extensión del bloqueo inducido por antisuero originado contra la combinación de

antígenos es significativamente mejorado comparado con el uso de antisuero originado contra los antígenos por sí solos, particularmente en dosis subóptimas de anticuerpo.

5 Composiciones de subunidad

La composición inmunogénica de la invención puede ser una composición de subunidad. Las composiciones de subunidad en las cuales los componentes han sido aislados y purificados en por lo menos 50%, preferiblemente por lo menos 60%, 70%, 80%, 90%
10 puros antes de mezclar los componentes para formar la composición inmunogénica.

La composición de subunidad antigénica de la invención preferiblemente comprende por lo menos 2 antígenos seleccionados de la siguiente lista: FhaB, PilC, Hsf, Hap, NadA, OMP85, proteasa
15 IgA, AspA, dominio pasajero de AspA, dominio pasajero de Hsf, dominio pasajero de Hap, FrpA, FrpC, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, TspA, TspB, PldA, PilQ, FhaC, NspA, y cualquiera o ambos de el inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

Las composiciones de subunidad pueden ser soluciones
20 acuosas de proteínas solubles en agua. Pueden comprender detergente, preferiblemente detergente no iónico, zwitteriónico, o iónico con el fin de solubilizar porciones hidrofóbicas de antígenos. Estos pueden comprender lípidos para que se formen las estructuras de liposoma, permitiendo la presentación de antígenos con una
25 estructura que abarca una membrana de lípido.

Preparaciones de vesícula de membrana exterior

El serogrupo B de *N. meningitidis* (menB) excreta ampollas de membrana exterior en suficientes cantidades para permitir su fabricación a una escala industrial. Una vesícula de membrana exterior también puede ser preparada a través del proceso de extracción de detergente de las células bacterianas (ver, por ejemplo, EP 11243).

La composición inmunogénica de la invención también puede comprender una preparación de vesícula de membrana exterior que tiene por lo menos dos antígenos que han sido regulados de manera ascendente, ya sea recombinantemente o a través de otros medios incluyendo crecimiento bajo condiciones de reducción de hierro. Ejemplos de antígenos que podrían regularse de manera ascendente en dicha preparación de vesícula de membrana exterior incluyen; NspA, Hsf, Hap, OMP85, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpA, TbpB, LbpB, PilQ, AspA, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, MafA, MafB y PldA. Dichas preparaciones opcionalmente también podrían contener cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

La fabricación de las preparaciones de ampolla de cepas de *Neisseria* puede ser lograda a través de cualquiera de los métodos bien conocidos por una persona con experiencia. Preferiblemente se utilizan los métodos descritos en EP 301992, EU 5,597,572, EP 11243 o EU 4,271, 147, Frederikson y otros (NIPH Annals [1991], 14:67-80), Zollinger y otros (J. Clin. Invest. [1979], 63:836-848),

Saunders y otros (Infect. Immun. [1999], 67: 113-119), Drabick y otros (Vaccine [2000], 18: 160-172) o WO01/09350 (Ejemplo 8). En general, los OMVs se extraen con un detergente, preferiblemente desoxicolato, y los ácidos nucleicos son opcionalmente removidos 5 enzimáticamente. La purificación se logra a través de ultracentrifugación opcionalmente seguida por cromatografía de exclusión de tamaño. Si 2 o más diferentes ampollas de la invención están incluidas, pueden ser combinadas en un contenedor individual para formar una preparación multivalente de la invención (aunque 10 una preparación también se considera multivalente si las diferentes ampollas de la invención son composiciones separadas en contenedores separados, las cuales se administran al mismo tiempo [la misma visita a un practicante] a un huésped). Las preparaciones OMV son usualmente esterilizadas a través de filtración a través de 15 un filtro de 0.2 μ m, y son preferiblemente almacenadas en una solución de sacarosa (por ejemplo, 3%) la cual se sabe que estabiliza las preparaciones de ampolla.

La regulación ascendente de proteínas dentro de las preparaciones de vesícula de membrana exterior puede ser lograda a 20 través de la inserción de una copia extra de un gen en una cepa Neisserial a partir de la cual la preparación OMV se deriva. Alternativamente, el promotor de un gen puede ser intercambiado por un promotor más fuerte en la cepa Neisserial, a partir de la cual la preparación OMV se deriva. Dichas técnicas se describen en WO 25 01/09350. La regulación ascendente de una proteína conducirá a una

nivel más alto de proteína que está presente en OMV comparado con el nivel de proteína presente en OMV derivada de *N. meningitidis* no modificada (por ejemplo, la cepa H44/76). Preferiblemente el nivel será de 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10 o 20 veces más alto.

5 Cuando se pretende que LPS sea un antígeno adicional en el OMV, se puede utilizar preferiblemente un protocolo que utiliza una concentración baja de detergente de extracción (por ejemplo desoxicolato o DOC) en el método de preparación OMV para así conservar los altos niveles de enlace a LPS mientras se remueve el

10 LPS pobremente enlazado, tóxico. La concentración de DOC utilizada es preferiblemente de 0-0.5% DOC, 0.02-0.4% DOC, 0.04-0.3% DOC más preferiblemente 0.06%-0.2% DOC o 0.08-0.15% DOC más preferiblemente alrededor de o exactamente 0.1% DOC.

"Secuencia promotora fuerte" se refiere a un elemento de

15 control regulador que incrementa la transcripción para un gen que codifica el antígeno de interés. "Expresión de la Regulación ascendente" se refiere a cualesquiera medios para mejorar la expresión de un antígeno de interés, con relación a esa ampolla no modificada (es decir, de existencia natural). Se entiende que la

20 cantidad de "regulación ascendente" variará dependiendo del antígeno particular de interés pero no excederá una cantidad que afectará la integridad de la ampolla. La regulación ascendente de un antígeno se refiere a la expresión que es de por lo menos 10% mayor que aquella de la ampolla no modificada. Preferiblemente es de por

25 lo menos 50% más alta. Más preferiblemente es de por lo menos

100% (dos veces) más alta. Más preferiblemente es de 3, 4, 5, 7, 10, 20 veces más alta. Alternativamente o adicionalmente, la expresión de la regulación ascendente puede referirse a la conversión de la expresión no condicional en cambios metabólicos o nutricionales, particularmente en el caso de TbpA, TbpB, LpbA y LpbB. Preferiblemente el nivel de expresión se evalúa cuando las ampollas se han derivado de crecimiento de bacterias en condiciones limitadas en hierro (por ejemplo en la presencia de un quelatador de hierro).

Otra vez para propósitos de claridad, los términos 'diseñando una cepa bacteriana para producir menos de dicho antígeno' o regulación descendente se refiere a cualesquiera medios para reducir la expresión de un antígeno (o la expresión de un producto de gen funcional) de interés, con relación a aquel del no modificado (es decir, ampolla de existencia natural), preferiblemente a través de eliminación, dicha expresión es de por lo menos 10% menor que aquella de la ampolla no modificada. Preferiblemente es por lo menos 50% más baja y de preferencia completamente ausente. Si la proteína regulada de manera descendente es una enzima o una proteína funcional, la regulación descendente puede lograrse introduciendo una o más mutaciones dando como resultado un 10%, 20%, 50%, 80% o preferiblemente un 100% de reducción en la actividad enzimática o funcional.

Los pasos de ingeniería requeridos para modular la expresión de proteínas de Neisserial pueden ser llevados a cabo en una variedad de formas conocidas por aquellos con experiencia en la

técnica. Por ejemplo, las secuencias (por ejemplo, promotoras o marcos de lectura abierta) pueden ser insertadas, y los promotores/genes pueden ser deteriorados a través de la técnica de la inserción de transposón. Por ejemplo, para regular de manera ascendente una expresión de gen, un promotor fuerte podría ser insertado a través de un transposón de hasta 2 kb en corriente ascendente del codón de iniciación del gen (más preferiblemente 200-600 bp en corriente ascendente, más preferiblemente aproximadamente 400 bp en corriente ascendente). La mutación o eliminación de punto también puede ser utilizada (particularmente para la expresión de la regulación descendente de un gen).

Dichos métodos, sin embargo, pueden ser completamente inestables, y por consiguiente se prefiere que el paso de ingeniería sea llevado a cabo a través de un evento de recombinación homólogo. Preferiblemente, el evento toma lugar entre una secuencia (una región recombinogénica) de por lo menos 30 nucleótidos en el cromosoma bacteriano, y una secuencia (una segunda región recombinogénica) de por lo menos 30 nucleótidos en un vector transformado dentro de la cepa. Preferiblemente, las regiones son de 40-1000 nucleótidos, preferiblemente de 100-800 nucleótidos, más preferiblemente de 500 nucleótidos). Estas regiones recombinogénicas deberán ser lo suficientemente similares que son capaces de hibridizarse una a la otra bajo condiciones altamente rígidas.

Los métodos utilizados para llevar a cabo los eventos de

modificación genética aquí descritos (tales como la regulación ascendente o regulación descendente en un genoma Neisserial) como se describe en WO 01/09350. Los promotores fuertes típicos que pueden estar integrados en *Neisseria* son *porA*, *porB*, *lgtF*, *Opa*,
 5 *p110*, *Ist*, y *hpuAB*. *PorA* y *PorB* son preferidos como promotores fuertes, constitutivos. Se ha establecido que la actividad del promotor *PorB* está contenida en un fragmento correspondiente a los nucleótidos -1 a -250 en corriente ascendente del codón de iniciación de *porB*.

10

Regulación ascendente de la expresión de antígenos a través del crecimiento en un medio limitado en hierro

La regulación ascendente de algunos antígenos en una preparación de vesícula de membrana exterior de la invención se logra preferiblemente a través del aislamiento de vesículas de
 15 membrana exterior de una cepa de los padres de *Neisseria* que crece bajo condiciones de limitación de hierro. Una baja concentración de hierro en el medio dará como resultado una expresión incrementada de proteínas involucradas en la adquisición de hierro incluyendo
 20 *TbpA*, *TbpB*, *LbpA*, *LbpB*, *HpuA*, *HpuB* y *P2086*. La expresión de estas proteínas es por lo tanto regulada en forma ascendente sin la necesidad de recombinantemente modificar el gen involucrado, por ejemplo a través de la inserción de un promotor más fuerte o insertando una copia adicional del gen. La invención también podría
 25 abarcar la regulación ascendente de proteínas de adquisición de

hierro a través del crecimiento en medio con limitación de hierro en donde el gen ha sido recombinantemente modificado.

La limitación de hierro se logra a través de la adición de un quelatador de hierro al medio de cultivo. Los quelatadores de hierro adecuados incluyen 2,2-Dipiridil, ácido EDDHA(etilenodiamina-di(o-hidroxifenilacético) y Desferal (mesilato de deferoxamina, Sigma). Desferal es el quelatador de hierro preferido y se agrega al medio de cultivo en una concentración de entre 10 y 100 μM , preferiblemente 25-75 μM , más preferiblemente 50-70 μM , de preferencia a 60 μM . El contenido de hierro del medio viene principalmente de extracto de levadura y constituyentes de peptona de soya y la cantidad presente puede variar entre los lotes. Por lo tanto las diferentes concentraciones de Desferal pueden ser óptimas para lograr la regulación ascendente de proteínas de adquisición de hierro en diferentes lotes del medio. Las personas con experiencia en la técnica fácilmente serán capaces de determinar la concentración óptima. En términos básicos, se deberá agregar suficiente quelatador de hierro al medio para regular de manera ascendente la expresión de la proteína regulada con hierro deseada, pero no tanto que afecte adversamente el crecimiento de la bacteria.

Preferiblemente, la regulación ascendente de las proteínas de adquisición de hierro a través del crecimiento bajo condiciones limitadas en hierro se combina con la regulación ascendente recombinante de otros antígenos para que la vesícula de la membrana exterior de la invención se logre.

Regulación descendente/Remoción de antígenos inmunodominantes variables y no protectores

Muchos antígenos de superficie son variables entre las cepas bacterianas y como una consecuencia son protectores solamente
5 contra un grupo limitado de cepas estrechamente relacionadas. Un aspecto de esta invención cubre las vesículas de membrana exteriores de la invención en la cual la expresión de las proteínas exteriores está reducida, o, preferiblemente, el gen(es) que codifican la proteína(s) de superficie se elimina. Dicha eliminación da como
10 resultado una cepa bacteriana que produce ampollas las cuales, cuando se administran en una vacuna, tienen un fuerte potencial para una reactividad cruzada contra varias cepas debido a una influencia más alta ejercida a través de proteínas conservadas (retenidas en las membranas exteriores) en el sistema inmune de las
15 vacunas. Ejemplos de dichos antígenos variables en *Neisseria* que pueden ser regulados de manera descendente en las composiciones inmunogénicas de ampolla de la invención incluyen PorA, PorB, Opa.

Otros tipos de genes que podrían ser regulados de manera descendente o desactivados son los genes que, *in vivo*, pueden
20 fácilmente ser activados (expresados) o desactivados a través de la bacteria. Ya que las proteínas de membrana exterior codificadas a través de dichos genes no siempre están presentes en la bacteria, la presencia de dichas proteínas en las preparaciones de ampollas también puede ser perjudiciales para la efectividad de la vacuna por
25 las razones anteriormente manifestadas. Un ejemplo preferido para

regular de manera descendente o eliminar es la proteína Opc de *Neisseria*. La inmunidad anti-Opc inducida por una Opc que contiene la vacuna de ampolla solamente tiene capacidad protectora limitada según el organismo que infecta puede convertirse fácilmente Opc⁺.

5 Por ejemplo, estos genes variables o no protectores pueden ser regulados de manera descendente en la expresión, o terminalmente desactivados. Esto tiene la ventaja de concentrar el sistema inmune en mejores antígenos que están presentes en cantidades bajas en las ampollas de superficie. Por regulación descendente también
10 significa que los bucles inmunodominantes, de superficie expuesta de las proteínas de membrana exterior anteriores puedan ser alteradas o eliminadas con el fin de hacer que la proteína de membrana exterior resultante sea menos inmunodominante.

 Los métodos para la regulación descendente de expresión se
15 describen en WO 01/09350. Las combinaciones preferidas de proteínas que van a ser reguladas de manera descendente en las composiciones inmunogénicas de ampolla de la invención incluyen PorA y OpA; PorA y OpC; OpA y OpC; PorA y OpA y OpC.

 Cuatro genes Opa diferentes se sabe que existen en el genoma
20 meningocócico (Aho y otros 1991 *Mol. Microbiol.* 5: 1429-37), por lo tanto cuando se dice que Opa va a ser regulado de manera descendente en la expresión quiere decir que preferiblemente 1, 2, 3, o (preferiblemente) los 4 genes presentes en el meningococo son así regulados de manera descendente. Dicha regulación descendente
25 puede ser llevada a cabo genéticamente como se describe en WO

01/09350 o buscando cepas meningocócicas estables, naturales, que se encuentran fácilmente, que no tienen o tienen una baja expresión a partir del sitio Opa. Dichas cepas pueden encontrarse utilizando la técnica descrita en Poolman y otros (1985 J. Med. Micro. 19: 203-
5 209) en donde las células que son Opa⁻ tienen un fenotipo diferente a Opa que expresa las células lo cual se puede ver buscando la aparición de las células en las placas o bajo el microscopio. Una vez encontrada, la cepa pueden ser mostrada como siendo establemente Opa⁻ llevando a cabo una tinción Western sobre el contenido de la
10 célula después de una corrida de fermentación para establecer la carencia de Opa.

Cuando la regulación ascendente de algunos antígenos en la vesícula de membrana exterior se logra a través del crecimiento bajo condiciones de limitación de hierro, la proteína variable FrpB
15 (Microbiology 142; 3269-3274, (1996); J. Bacteriol. 181; 2895-2901 (1999)) también será regulada de manera ascendente. Los inventores han encontrado que es ventajoso regular de manera descendente la expresión de FrpB bajo estas circunstancias regulando de manera descendente la expresión de la proteína completa como se describe
20 en WO 01/09350 o eliminando la región(es) variable de FrpB. Esto asegurará que la respuesta inmune provocada por la composición inmunogénica se dirige hacia los antígenos que están presentes en un amplio rango de cepas. La regulación descendente de FrpB está preferiblemente combinada con la regulación descendente de PorA y
25 OpA; PorA y OpC; OpA y OpC; PorA y OpA y OpC en las

Ab

composiciones inmunogénicas de ampolla de la invención. En una modalidad alternativa de la invención, FrpB se regula de manera descendente en las vesículas de membrana exterior que han sido preparadas a partir de cepas de *Neisseria* no creciendo bajo
5 condiciones de limitación de hierro.

Desintoxicación de LPS

Las ampollas de las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser desintoxicadas a través de métodos para la
10 desintoxicación de LPS los cuales se describen en WO 01/09350. En particular los métodos para la desintoxicación de LPS de la invención involucran la regulación descendente/eliminación de las enzimas hrtB y/o msbB que se describen en WO 01/09350. Los genes msbB y hrtB de *Neisseria* también son llamados lpxL1 y lpxL2, respectivamente
15 (WO 01/09350) y las mutaciones de eliminación de estos genes se caracterizaron fenotípicamente a través de LOS del mutante msbB que pierde una cadena de acilo secundaria), y de LOS del mutante hrtB que pierde ambas cadenas de acilo secundarias. WO 93/03327 describe equivalentes funcionales del péptido no tóxico de polimicina
20 B que pueden ser utilizados en las composiciones de la invención.

Dichos métodos preferiblemente se combinan con métodos de extracción de ampollas que involucran bajos niveles de DOC, preferiblemente de 0-0.3% DOC, más preferiblemente 0.05%-0.5% DOC, más preferiblemente alrededor de o exactamente 0.1% DOC.

25 Los métodos adicionales para la desintoxicación de LPS

incluyen agregar a las preparaciones de ampolla un equivalente funcional de péptido no tóxico de polimixina B (preferiblemente SEAP 2) como se describe anteriormente.

5 Polisacáridos de reacción cruzada

El aislamiento de ampollas de membrana exterior de bacteria Gram-negativa encapsulada por lo general da como resultado la copurificación del polisacárido capsular. En algunos casos, este material "contaminante" puede probar ser útil ya que el polisacárido puede mejorar la respuesta inmune conferida a través de otros componentes de ampolla. En otros casos sin embargo, la presencia del material de polisacárido contaminante en preparaciones de ampolla bacterianas puede probar un deterioro en el uso de ampollas en una vacuna. Por ejemplo, se ha mostrado que por lo menos en el caso de *N. meningitidis* que el polisacárido capsular del serogrupo B no confiere inmunidad protectora y es susceptible de inducir una respuesta autoinmune adversa en seres humanos. Consecuentemente, las vesículas de membrana exterior de la invención pueden ser aisladas de una cepa bacteriana para producción de ampollas, la cual ha sido diseñada de tal forma que está libre de polisacárido capsular. Las ampollas entonces serán adecuadas para uso en seres humanos. Un ejemplo particularmente preferido de dicha preparación de ampolla es uno del serogrupo B de *N. meningitidis* de polisacárido capsular.

25 Esto se puede lograr utilizando cepas de producción de

ampollas modificadas en las cuales los genes necesarios para la biosíntesis capsular y/o exportación han sido dañadas. La inactivación del gen que codifica la biosíntesis del polisacárido capsular o exportación puede lograrse a través de la mutación (mutación de punto, eliminación o inserción) ya sea de la región de control, la región de codificación, o ambas (preferiblemente utilizando técnicas de recombinación homólogas descritas anteriormente), o a través de cualquier otra forma para disminuir la función enzimática de dichos genes. Además, la inactivación de los genes de biosíntesis capsular también se puede lograr a través de la sobre expresión antisentido o mutagénesis de transposón. Un método preferido es la eliminación de algunos o todos los genes *cps* de *Neisseria meningitidis* requeridos para la biosíntesis y exportación del polisacárido. Para este propósito, el plásmido de reemplazo pMF121 (descrito en Frosh y otros 1990, Mol. Microbiol. 4:1215-1218) puede ser utilizado para entregar una eliminación de la butación del grupo de genes *cpsCAD(+galE)*.

La seguridad de los anticuerpos originados para LPS L2 y L3 ha sido cuestionados, debido a que la presencia de una estructura similar al grupo de oligosacárido de N-neotetraosa (Ga β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-) presente en glicofigolípidos humanos. Aun si un gran número de personas ha sido vacunado sin peligro con vacunas de vesícula extraídas de desoxicolato conteniendo una cantidad residual de LPS L3 (G. Bjune y otros, Lancet (1991), 338,1093-1096; GVG. Sierra y otros, NIPH ann (1991), 14,195-210).

la eliminación de la parte terminal de el LOS sacarídico es ventajosa en la prevención de cualquier reacción cruzada con estructuras presente en la superficie de los tejidos humanos. En una modalidad preferida, la inactivación del gen *lgtB* en una estructura LPS intermedia en la cual el residuo de galactosa terminal y el ácido siálico están ausentes (la mutación deja una estructura 4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1- en LOS L2 y L3). Dichos intermediarios podrán ser obtenidos en una cepa LPS L3 y L2. Una versión alternativa y menos preferida (corta) de LPS puede ser obtenida a través de la desactivación del gen *lrte*. Una versión alternativa adicional y menos preferida de LPS puede ser obtenida desactivando el gen *lata*. Si se selecciona dicha mutación *lgtA*⁻ se prefiere también desactivar la expresión de AGTC para prevenir que sea formado el inmunotipo L1 no inmunogénico.

Los mutantes *LgtB*⁻ son más preferidos según los inventores que está es la truncación óptima para resolver el aspecto de seguridad mientras aún conserva un epítipo de oligosacárido protector LPS que aún puede inducir una respuesta de anticuerpo bactericida.

Por consiguiente, las composiciones inmunogénicas de la invención además comprenden preparaciones L2 y L3 (ya sea purificadas o en una ampolla aislada) o preparaciones de ampolla meningocócicas en general son ventajosamente derivadas de una cepa *Neisserial* (preferiblemente meningocócica) que ha sido diseñada genéticamente para permanentemente regular de forma

descendente la expresión del producto de gen funcional del gen lgtB, lgtA o lgtE, preferiblemente desactivando el gen, más preferiblemente eliminando todo o parte del promotor y/o el marco de lectura abierta del gen.

- 5 Cuando las composiciones inmunogénicas anteriores de la invención se derivan de una cepa B de meningococo, además se prefiere que el polisacárido capsular (el cual también contiene estructuras de sacárido de tipo humano) también sea removido. Aunque muchos genes podrían ser desactivados para lograr esto, los
- 10 inventores han mostrado ventajosamente que se prefiere que la cepa de producción de ampollas haya sido genéticamente diseñadas para permanentemente regular de manera descendente la expresión del producto de gen funcional del gen siaD (es decir, regulando de forma descendente la actividad de polisialitransferasa α -2-8),
- 15 preferiblemente desactivando el gen, más preferiblemente eliminando todo o parte del promotor y/o marco de lectura abierto del gen. Dicha inactivación se describe en WO 01/09350. La mutación siaD (también conocida como synD) es la más ventajosa de muchas mutaciones que pueden dar como resultado la remoción del epítipo de tipo humano
- 20 del polisacárido capsular, debido a que es una de las únicas mutaciones que no tienen efecto en la biosíntesis de los epítopos protectores de LOS, de esta forma siendo ventajoso en un proceso que ayuda a finalmente al uso de LOS como un antígeno protector, y tiene un efecto mínimo en el crecimiento de la bacteria. Un aspecto
- 25 preferido de la invención es por consiguiente una preparación

inmunogénica de ampolla como se describió anteriormente la cual se deriva de una cepa mutante de meningococo B *IgtE⁻ siaD⁻*, una *IgtA⁻ siaD⁻* o, preferiblemente, una *IgtB⁻ siaD⁻*. La cepa por sí sola es un aspecto adicional de la invención.

5 Aunque la mutación *siaD⁻* es preferible por las razones anteriores, otras mutaciones que desactivan la síntesis de polisacárido capsular de meningococo B pueden ser utilizadas. De esta forma la cepa de producción de ampollas puede ser genéticamente diseñada para permanentemente regular de manera
10 descendente la expresión del producto de gen funcional de uno o más de los siguientes genes: genes *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *siaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*), preferiblemente desactivando el gen, más preferiblemente eliminando todo o parte del promotor y/o marco de
15 lectura abierto del gen. La mutación *IgtE⁻* puede ser combinada con una o más de estas mutaciones. Preferiblemente la mutación *IgtB⁻* se combina con una o más de estas mutaciones. Un aspecto adicional de la invención es por consiguiente una preparación inmunogénica de ampolla como se describió anteriormente la cual se deriva de dicha
20 cepa mutante combinada de meningococo B. La cepa por sí misma es un aspecto adicional de la invención.

Un centro Neisserial que contiene varios genes *Igt*, incluyendo *IgtB* e *Irte*, y su secuencia es conocido en la técnica (M. P. Jennings y otros, *Microbiology* 1999,145, 3013-3021 y referencias citadas ahí,
25 y *J. Exp. Med.* 180: 2181-2190 [1994]).

Cuando se va a utilizar LOS de longitud completa (no truncado) en el producto final, es deseable para LOS que no estén sialilados (es decir LOS genera una respuesta inmune contra las cepas meningocócicas invasoras, más peligrosas las cuales también están desialiladas. En dicho caso al utilizar una cepa negativa de cápsula que tiene un gen *synA* eliminado (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *siaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*) es ventajoso, como tal una mutación también convierte *menB* LOS en incapaz de ser sialilado.

En las preparaciones de ampolla, particularmente en preparaciones extraídas con concentraciones de DOC bajas, LPS puede ser utilizado como un antígeno en la composición inmunogénica de la invención. Es sin embargo ventajoso regular de manera descendente/eliminar/desactivar la función enzimática de cualquiera de *lrte*, *lgtA* (principalmente en combinación con *lgtC*), o, preferiblemente, productos de gen/genes *lgtB* con el fin de remover estructuras lacto-N-neotetraosa de tipo humano. El centro Neisserial (y secuencias del mismo) comprendiendo los genes *lgt* para la biosíntesis de la estructura del oligosacárido LPS es conocido en la técnica (Jennings y otros Microbiology 1999, 145; 3013-3021 y referencias citadas ahí, y J. Exp. Med. 180: 2181-2190 [1994]). La regulación de forma descendente/eliminación de *lgtB* (o el producto de gen funcional) se prefiere ya que deja el epítipo protector de LPS intacto.

En las preparaciones de ampollo del serogrupo B de *N.*

meningitidis de la invención, la regulación descendente/eliminación de ambos, *siaD* y *lgtB* es son preferidas, (aunque una combinación de *lgtB*⁻ con cualquiera de *ctrA*⁻, *ctrB*⁻, *ctrC*⁻, *ctrD*⁻, *synA*⁻ (equivalente a *synX*⁻ y *siaA*⁻), *synB*⁻ (equivalente a *siaB*⁻) o *synC*⁻ (equivalente a *siaC*⁻) en una cepa de producción de ampolla de meningococo B también se pueden utilizar) conduciendo a una preparación de ampolla con una seguridad óptima y retención del epítipo protector de LPS.

Un aspecto adicional de la invención es por consiguiente una preparación inmunogénica de ampolla como se describió anteriormente la cual se deriva de dicha cepa mutante combinada de meningococo B. La cepa por sí sola es un aspecto adicional de la invención.

La composición inmunogénica de la invención puede comprender por lo menos uno, dos, tres, cuatro, o cinco diferentes preparaciones de vesícula de membrana exterior. Cuando dos o más preparaciones OMV están incluidas, por lo menos un antígeno de la invención es regulado de manera ascendente en cada OMV. Dichas preparaciones OMV pueden derivarse de cepas *Neisserial* de las mismas especies y serogrupo o preferiblemente de cepas *Neisserial* de diferentes clases, serogrupo, serotipo, subserotipo o inmunotipo. Por ejemplo, una composición inmunogénica puede comprender una o más preparaciones de vesícula de membrana exterior que contienen LPS del inmunotipo L2 y una o más preparaciones de vesícula de membrana exterior que contienen LPS del inmunotipo L3, L2 o

preparaciones OMV L3 son preferiblemente derivadas de una cepa estable que tiene una variabilidad de fase mínima en el centro del gen de síntesis del oligosacárido de LPS.

5 Vesículas de membrana exterior combinadas con composiciones de subunidad

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender ambas, una composición de subunidad y una vesícula de membrana exterior. Existen varios antígenos que son particularmente adecuados para la inclusión en una composición de subunidad debido a su solubilidad. Ejemplos de dichas proteínas son: FhaB, NspA, dominio pasajero de Hsf, dominio pasajero de Hap, dominio pasajero de AspA, AspA, OMP85, FrpA, FrpC, TbpB, LbpB, PilQ. La preparación de vesícula de membrana exterior podría tener por lo menos un antígeno diferente seleccionado de la lista siguiente que ha sido recombinantemente regulado de forma ascendente en la vesícula de membrana exterior: NspA, Hsf, Hap, OMP85, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpA, TbpB, LbpB, NadA, TspA, TspB, PilC, PilQ, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, MafA, MafB y PldA; y opcionalmente
20 comprende cualquiera o ambos de los inmunotipo L2 de LPS o inmunotipo L3 de LPS.

Composiciones inmunogénicas específicas de la invención

En las combinaciones específicas listadas a continuación, en
25 donde las combinaciones de antígenos están presentes en una

ampolla, dichas combinaciones de antígenos deberán ser reguladas en forma ascendente como se describió anteriormente.

Una modalidad particularmente preferida de la invención comprende una proteína autotransportadora, más preferiblemente Hsf y TbpA (alta) y/o TbpA (baja). Dichas composiciones inmunogénicas pueden más preferiblemente además comprender por lo menos uno de OMP 85, FrpA, FrpC, LbpA, LbpB, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, TspA, NadA, TspB, PilQ, FhaC, NspA, PldA, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, FhaB, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, VapD y Hap. Todas las composiciones inmunogénicas anteriores además pueden comprender cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

Una modalidad adicional preferida de la invención comprende Hsf y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, P2086, HpuA, HpuB, Lipo28, Sibp, Hap, AspA, proteasa IgA, OMP85, NspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, FhaC, NadA, PldA, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB. Todas las composiciones inmunogénicas anteriores además pueden comprender cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden Hsf y OMP85 (opcionalmente con uno o más de Hap, FrpA y LbpB); Hsf y Hap (opcionalmente con uno o más de FrpA, LbpB u OMP85); Hsf y FrpA (opcionalmente con uno o más de Hap, LbpB u OMP85); Hsf y LbpB (opcionalmente co

uno o más de Hap, OMP85 o FrpA). Mientras Hsf es una adhesina y una proteína autotransportadora, una combinación particularmente preferida comprende Hsf, OMP85, TbpA, el inmunotipo L2 de LPS y/o el inmunotipo L2, preferiblemente en una preparación de ampolla
 5 multivalente, que tiene miembros de los cinco grupos de antígenos representados. Preferiblemente ambos, TbpA(bajo) y TbpA (alto) están presentes.

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende FhaB y por lo menos un antígeno adicional seleccionado
 10 del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, TdfH, PorB, PldA, Hap, proteasa IgA, AspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA y TspB, y
 15 cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden FhaB y Hsf (opcionalmente con uno o más de OMP85, LbpB, Hap o FrpA); FhaB y OMP85 (opcionalmente con uno o más de LbpB, Hap o FrpA); FhaB and LbpB (opcionalmente con uno o más de Hap o FrpA); FhaB y Hap
 20 (opcionalmente con FrpA). Una combinación preferida comprende FhaB, LbpB, Hsf (como un OMP) y FrpA la cual tiene miembros de los cinco grupos de antígenos presentados.

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende NspA y por lo menos un antígeno adicional seleccionado
 25 del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB,

LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, OMP85, PilQ, AspA, proteasa IgA, NadA, PldA, Hsf, Hap, TspA, TspB, TdfH, PorB, y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.. Las combinaciones preferidas
 5 comprenden NspA y Hsf (opcionalmente con uno o más de OMP85, Hap, LbpA o TbpA); NspA y OMP85 (opcionalmente con uno o más de Hap, LbpA o TbpA); NspA y Hap (opcionalmente con uno o más de LbpA o TbpA); NspA y LbpA (opcionalmente con TbpA). Una combinación particularmente preferida comprende NspA, Hsf, TbpA,
 10 inmunotipo L2 y/o L3 de LPS, preferiblemente en una preparación de ampolla multivalente, la cual tiene miembros de los cinco grupos de antígeno representados. Preferiblemente tanto TbpA (bajo) como TbpA (alto) están presentes.

Las composiciones inmunogénicas con combinaciones
 15 individualizadas de antígenos descritos en WO 00/25811 no se reclaman en esta invención. Preferiblemente, las composiciones inmunogénicas o vacunas no están cubiertas a través de la presente invención si tienen un contenido de antígeno que consiste solamente de proteína de unión a transferina y NspA (o en el caso de una
 20 vacuna de ampolla, tiene un contenido de antígeno regulado en forma ascendente o enriquecido que consiste solamente de proteína que se une a transferina y NspA), sin embargo las combinaciones específicas de antígenos (o antígenos regulados en forma ascendente) que consisten de o incluyen NspA así como ambos TbpA
 25 (alto) y TbpA (bajo) pueden ser incluidos. Opcionalmente, las

composiciones o vacunas comprenden una combinación (subunidad) o regulación en forma ascendente (ampolla) de proteína que se une a transferina y NspA no se reclama.

Una composición inmunogénica adicional de la invención
 5 comprende NadA y por lo menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, OMP85, NspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, HpuA, HpuB, AspA, proteasa IgA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB, y cualquiera o
 10 ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

Una composición inmunogénica de la invención comprende TbpA(bajo) y por lo menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, proteasa IgA, NspA, HpuA, HpuB, Hap, OMP85, NspA (cuando
 15 además está combinado con TbpA (alto)), PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, AspA, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB, y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden TbpA (bajo) y Hsf y
 20 LbpA; TbpA (bajo) y OMP85 (opcionalmente con ambos o cualquiera de LbpA y Hap); TbpA (bajo) y LbpA y Hap.

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende TbpA (alto) y por lo menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, Hap, OMP85, NspA (cuando además se combina con TbpA
 25

(bajo)), PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, MafA, MafB, AspA, proteasa IgA, PldA, FhaB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB and FhaB, y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden TbpA (alto) y Hsf y LbpA; TbpA (alto) y OMP85 (opcionalmente con cualquiera o ambos de LbpA y Hap); TbpA(alto) y LbpA y Hap.

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende LpbA y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, proteasa IgA, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB y FhaB y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden LbpA y Hsf (opcionalmente con Hap).

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende LpbB y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpA, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC,, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, proteasa IgA, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB y FhaB, y FhaB y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden LbpB y Hsf (opcionalmente con uno o más de OMP85, Hap o FrpA);

LbpB y OMP85 (opcionalmente con uno o más de Hap o FrpA); LbpB y Hap (opcionalmente con FrpA).

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende OMP85 y por lo menos un antígeno adicional
 5 seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, proteasa IgA, AspA, Hsf, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, PilQ, TdfH, PorB y FhaB, y FhaB, y FhaB y
 10 cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden OMP85 y Hsf (opcionalmente con uno o más de LbpA o NspA); OMP85 y LbpA (opcionalmente con uno o más de Hap y NspA); OMP85 y Hap (opcionalmente con NspA).

15 Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende Hap y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, NspA, proteasa
 20 IgA, AspA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, Poro y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

Una composición inmunogénica adicional de la invención
 25 comprende FrpA y por lo menos un antígeno adicional seleccionado

del grupo que consiste de LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, proteasa IgA, AspA, NadA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, OMP85, NspA, PilC, 5 Omp26, NMB0315, NMB0995, NMBI 119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB, y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende FrpC y por lo menos un antígeno adicional seleccionado 10 del grupo que consiste de LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, proteasa IgA, AspA, NadA, FhaB, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB, y cualquiera 15 o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, 20 HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, proteasa IgA, AspA, NadA, FhaB, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB.

Las combinaciones preferidas de antígenos en una composición 25 inmunogénica de la invención incluyen combinaciones que

comprenden una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y FhaB; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y PilC; y una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y FrpA; una
 5 proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y Pilq; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y TspA; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y TspB; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y NspA; una proteína de
 10 adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y FrpC; más preferiblemente comprende una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y Hap; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y FrpA/C; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y LbpB; una
 15 proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y OMP85 (D15). Más preferiblemente, OMP85(D15) podría ser incorporada como parte de una preparación de vesícula de membrana exterior.

Las composiciones inmunogénicas de la invención que
 20 contienen LPS preferiblemente tendrán el LPS conjugado con una fuente de epítomos ayudantes T, preferiblemente proteínas, y en el caso de LPS en OMVs, preferiblemente proteínas de membrana exterior. Una modalidad particularmente preferida contiene LPS que ha sido (preferiblemente intra-ampolla) conjugada con OMP *in situ* en
 25 la preparación de la vesícula de membrana exterior (por ejemplo

como se describió anteriormente).

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender antígenos (proteínas, LPS y polisacáridos) derivados de los serogrupos A, B, C, Y, W-135 de *Neisseria meningitidis* o
5 *Neisseria gonorrhoeae*.

Preferiblemente las composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención no consisten de y/o comprenden las combinaciones particulares de SEC IDs listadas en el Cuadro que abarca de la página 3, línea 18 a la página 52, línea 2 de WO 00/71725 y/o
10 cualquier combinación individual descrita en los ejemplos 1-11 de WO 00/71725.

Preferiblemente, cualesquiera combinaciones individualizadas descrita en WO 01/52885 no se reclaman en esta invención.

15 Combinaciones adicionales

La composición inmunogénica de la invención además puede comprender polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos. Los polisacáridos u oligosacáridos capsulares pueden ser derivados de uno o más de los serogrupos A, B, C, Y, W-135 de *Neisseria*
20 *meningitidis*, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, Streptococci Grupo A, Streptococci Grupo B, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Un aspecto adicional de la invención son las combinaciones de vacunas que comprenden la composición antigénica de la invención
25 con otros antígenos que son ventajosamente utilizados contra ciertos

estados de las enfermedades incluyendo aquellos asociados con bacteria viral o Gram-positiva.

En una combinación preferida, las composiciones antigénicas de la invención se formulan con 1, 2, 3, o preferiblemente los cuatro
5 polisacáridos u oligosacáridos capsulares meningocócicos siguientes, los cuales pueden ser puros o conjugados a un portador de proteína; A, C, Y o W-135. Preferiblemente las composiciones inmunogénicas de la invención se formulan con A y C; o C; o C y Y. Dicha vacuna contiene proteínas de *N. meningitidis*, preferiblemente
10 del serogrupo B puede se ventajosamente utilizada como una vacuna meningocócica global.

En una modalidad adicional, las composiciones antigénicas de la invención, preferiblemente formuladas con 1, 2, 3, o los cuatro polisacáridos u oligosacáridos capsulares meningocócicos puros o
15 conjugados A, C, y o W-135 (como se describió anteriormente) se formulan con un polisacárido u oligosacárido capsular de *H. influenza* b, y/o uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares neumocócicos puros o conjugados. Opcionalmente, la vacuna también puede comprender uno o más antígenos de proteína que
20 pueden proteger un huésped contra infección por *Streptococcus pneumoniae*. Dicha vacuna puede ser ventajosamente utilizada como una vacuna de meningitis global.

En aún otra modalidad preferida, la composición inmunogénica de la invención se formula con polisacáridos u oligosacáridos
25 capsulares derivados de una o más de *Neisseria meningitidis*,

Haemophilus influenzae b, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococci* Grupo A, *Streptococci* Grupo B, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*. Los antígenos de polisacárido capsulares neumocócicos preferiblemente se seleccionan de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (más preferiblemente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Una modalidad adicional preferida podría contener los polisacáridos capsulares PRP de *Haemophilus influenzae*. Una modalidad preferida adicional podría contener el Tipo 5, Tipo 8 o 336 de polisacáridos capsulares de *Streptococcus aureus*. Una modalidad preferida adicional podría contener el Tipo I, Tipo II o Tipo II de polisacáridos capsulares de *Streptococcus epidermis*. Una modalidad preferida adicional podría contener el Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II o Tipo III de polisacáridos capsulares de streptococcus del Grupo B. Una modalidad preferida adicional podría contener los polisacáridos capsulares del streptococcus del Grupo A, preferiblemente además comprendiendo por lo menos una proteína M y más preferiblemente múltiples tipos de proteína M.

20 Dichos polisacáridos capsulares de la invención pueden estar no conjugados o conjugados con una proteína portadora tal como la anatoxina del tétanos, el fragmento de la anatoxina del tétanos C, la anatoxina de difteria, CRM197, pneumolisina, Proteína D (US6342224). El polisacárido conjugado puede ser preparado a través de cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo el

polisacárido puede ser acoplado a través de un linaje de tioéter. El método de conjugación se basa en la activación del polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado de esta forma
5 puede ser acoplado directamente a través de un grupo espaciador a un grupo amino en la proteína portadora. Preferiblemente, el éster de cianato está acoplado con hexano de diamina y el polisacárido derivatizado de amino se conjuga a la proteína portadora utilizando química de heteroligación involucrando la formación del linaje de
10 tioéter. Dichos conjugados se describen en la aplicación PCT publicada WO 93/15760 de la Universidad de Servicios Uniformados.

Los conjugados también pueden ser preparados a través de métodos de animación reductiva directa como se describe en US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros métodos se
15 describen en EP-0-161-188, EP-208375 Y EP-0-477508. Un método adicional involucra el acoplamiento de un polisacárido activado de bromuro de cianógeno derivatizado con hidracida de ácido atípico (ADH) a la proteína portadora a través de condensación de carbodiimida (Chu C. y otros Infect. Immunity, 1983 245 256).
20 Cuando los oligosacáridos están incluidos, se prefiere que estén conjugados.

Los antígenos de proteínas pneumocócicas preferidos son aquellas proteínas pneumocócicas que están expuestas en la superficie exterior de los pneumococos (capaces de ser reconocidas
25 a través de un sistema inmune del huésped durante por lo menos

parte del ciclo de vida del pneumococo), o son proteínas que se secretan o liberan a través del pneumococo. Más preferiblemente, la proteína es una toxina, adhesina, transductor de señal de 2 componentes, o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o fragmentos del mismo. Las proteínas particularmente preferidas incluyen, pero no se limitan a: pneumolisina (preferiblemente desintoxicada a través del tratamiento químico o mutación) [Mitchell y otros Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18 (13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2, "Mitchell y otros Biochem Biophys Acta 1989 Enero 23; 1007(1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties.", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton y otros), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de eliminación del mismo (US 5804193-Briles y otros) ; PspC y variantes de eliminación del mismo (WO 97/09994-Briles y otros); PsaA y variantes de eliminación del mismo (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dic; 64 (12): 5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); proteínas de unión a colina pneumococcica y variantes de eliminación del mismo; CbpA y variantes de eliminación del mismo (WO 97/41151; WO 99/51266); Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64: 3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato y otros, FEMS Microbiol Lett 1998, 164: 207-14); proteína de tipo M, (EP 0837130) y adhesina 18627, (EP 0834568). Los antígenos de proteína

pneumocócicos preferidos adicionales son aquellos descritos en WO 98/18931, particularmente aquellos seleccionados en WO98/18930 y PCT/US99/30390.

La composición/vacuna inmunogénica de la invención también
 5 puede opcionalmente comprender preparaciones de vesícula de membrana exterior hechas de otras bacterias Gram negativas, por ejemplo, *Moraxella catarrhalis* o *Haemophilus influenzae*.

Preparaciones de ampollas *Moraxella catarrhalis*

10 Las composiciones de la invención además pueden comprender preparaciones OMV derivadas de *Moraxella catarrhalis*. Las preparaciones OMV diseñadas pueden derivarse de *Moraxella catarrhalis* como se describe en WO 01/09350. Uno o más de los siguientes genes (codificando los antígenos protectores) son
 15 preferidos para la regulación ascendente: OMP106 (WO 97/41731 & WO 96/34960), HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85(PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977.2), lipo10 (GB 9918208.1), lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038), ompCD, CopB (Helminen ME, y otros (1993)
 20 Infect. Immun. 61: 2003-2010), D15 (PCT/EP99/03822), Omp1A1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), LbpA y LbpB (WO 98/55606), TbpA y TbpB (WO 97/13785 & WO 97/32980), OmpE, UspA1 y UspA2 (WO 93/03761), y Omp21. También son preferidos
 25 otras bacterias Gram-negativas.

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la regulación descendente: CopB, OMP106, OmpB1, TbpA, TbpB, LbpA, y LbpB.

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la
5 regulación descendente: htrB, msbB y lpxK.

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la regulación ascendente: pmrA, pmrB, pmrE y pmrF.

Preparaciones de ampollas *Haemophilus influenzae*

10 Las composiciones inmunogénicas de la invención además comprenden preparaciones OMV derivadas de *Haemophilus influenzae*. Las preparaciones OMV diseñadas pueden derivarse de *Haemophilus influenzae* como se describe en WO 01/09350. Uno o más de los siguientes genes (codificando los antígenos protectores)
15 son preferidos para la regulación ascendente: D15 (WO 94/12641), P6 (EP 281673), TbpA (W096/40929; W095/13370), TbpB (W096/40929; W095/13370), P2, P5 (WO 94/26304), OMP26 (WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hsf, Hap, Hin47, y Hif (todos los genes en este gen operador deberán ser regulados de
20 manera ascendente con el fin de regular de manera ascendente pilin). También son preferidos como genes que pueden ser heterológicamente introducidos en otras bacterias Gram-negativas.

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la regulación descendente: P2, P5, Hif, proteasa IgA1-, HgpA, HgpB,
25 HMW1, HMW2, Hxu, htrB, msbB e lpxK.

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la regulación ascendente: *pmrA*, *pmrB*, *pmrE*, y *pmrF*.

Las composición/vacuna inmunogénica de la invención también puede opcionalmente comprender antígenos que proveen protección
 5 contra una o más infecciones por Difteria, tétanos y *Bordetella pertussis*. El componente de tosferina puede ser la célula *B. pertussis* completa aniquilada (Pw) o tosferina acelular (Pa) que contiene por lo menos un antígeno (preferiblemente 2 o los 3) de PT, FHA y peractina 69kDa. Típicamente, los antígenos que proveen protección
 10 contra Difteria y tétanos podrían ser anatoxinas de difteria y anatoxinas de tétanos. Las anatoxinas pueden químicamente inactivar toxinas o toxinas inactivadas por la introducción de mutaciones de punto.

Las composición/vacuna inmunogénica de la invención también
 15 puede opcionalmente comprender uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra *Haemophilus influenzae*, RSV y/o uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra el virus de la influenza. Dicha vacuna puede ser ventajosamente utilizada como una vacuna de medio de otitis global.

20 Los antígenos de proteína de *H. influenzae* no tipificables preferidos incluyen la proteína de Fimbrina (US 5766608) y fusiones que comprenden péptidos de las mismas (por ejemplo, Fusión LB1) (US 5843464-Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, proteína D, TbpA, TbpB, Hia, Hmwl, Hmw2, Hap, y D15.

25 Los antígenos del virus de influenza preferidos incluyen virus

completo, vivo o inactivado, virus de influenza dividido, crecido en
 huevos o células MDCK, o células Vero o virosomas de gripe
 completas (como se describe por R. Gluck, Vaccine, 1992,10, 915-
 920) o proteínas purificadas o recombinantes, tales como las
 5 proteínas HA, NP, o M, o combinaciones de las mismas.

Los antígenos RSV preferidos (Virus Sincitial Respiratorio)
 incluyen la glicoproteína F, la glicoproteína G, la proteína NH, la
 proteína M o derivados de la misma.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden
 10 incluir proteínas de *Moraxella catarrhalis* que incluyen TbpA
 (W097/13785; W099/52947), TbpB (W097/13785; W099/52947;
 Mathers y otros FEMS Immunol Med Microbiol 1997 19; 231-236;
 Myers y otros Infect Immun 1998 66; 4183-4192), LbpA, LbpB (Du y
 otros Infect Immun 1998 66; 3656-3665), UspA1, UspA2 (Aebi y otros
 15 Infect Immun. 1997 65; 4367-4377), OMP106 (US6214981), receptor
 dependiente de Ton-B (WO00/78968), CopB (Sethi y otros, Infect.
 Immun. 1997 65; 3666-3671), y receptor de HasR (WO00/78968); las
 proteínas de *Haemophilus influenzae* incluyen HMW (St Geme y
 otros, Infect Immun 1998 66; 364-368), Hia (St Geme y otros J.
 20 Bacteriol. 2000 182; 6005-6013), Tbp1 (W096/40929; W095/13370),
 Tbp2 (W096/40929; W095/13370; Gray-Owen y otros Infect Immun
 1995 63; 1201-1210), LbpA, LbpB (Schryvers y otros 1989,29: 121-
 130), HasR, receptor dependiente de TonB (Fleishmann y otros
 Science 1995 269; 496-512), proteína de unión a hemoglobina, HhuA
 25 (Cope y otros Infect Immun 2000 68; 4092-4101), HgpA (Maciver y

otros, Infect Immun 1996 64; 3703-3712), HgbA, HgbB y HgbC (Jin y otros Infect Immun 1996 64; 3134-3141), HxuA (Cope y otros, Mol Microbiol 1994 13; 863-873), HxuC (Cope y otros, Infect Immun 2001 69; 2353-2363); las proteínas de *Neisseria meningitidis* incluyen
 5 Tbp1, Tbp2, FbpA, FbpB, BfrA, BfrB (Tettelin y otros, Science 2000 287; 1809-1815), LbpA, LbpB y HmbR.

Formulaciones de vacuna

Una modalidad preferida de la invención es la formulación de la
 10 composición inmunogénica de la invención en una vacuna que también puede comprender un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

La fabricación de las preparaciones de vesícula de membrana exterior de cualquiera de las cepas anteriormente mencionadas
 15 puede ser lograda a través de cualquier método bien conocido para alguien con experiencia en la técnica. Preferiblemente se utilizan los métodos descritos en EP 301992, US 5,597,572, EP 11243 o US 4,271,147. Más preferiblemente se utiliza el método descrito en WO01/09350.

20 La preparación de vacuna generalmente se describe en El Diseño de Vacuna ("La subunidad y el método auxiliar" (eds. Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York).

Las composiciones antigénicas de la presente invención pueden ser auxiliadas en la formulación de la vacuna de la
 25 invención. Los auxiliares adecuados incluyen sal de aluminio tal

como hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio (particularmente carbonato de calcio), hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados
5 catiónicamente o aniónicamente, o polifosfacenos.

Los sistemas auxiliares Th1 adecuados que pueden ser utilizados incluyen, lípido A de monofosforilo, particularmente lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado, y una combinación de lípido A de monofosforilo, lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado (3D- MPL)
10 junto con una sal de aluminio (preferiblemente fosfato de aluminio).
Un sistema mejorado involucra la combinación de un lípido A de monofosforilo y un derivado de saponina particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en WO 94/00153, o una composición menos reconocida en donde QS21 se extingue con
15 colesterol como se describe en WO 96/33739. Una formulación auxiliar potente que involucra QS21 3D-MPL y tocoferol es un aceite en emulsión de agua se describe en WO 95/17210 y es una formulación preferida.

La vacuna puede comprender una saponina, más
20 preferiblemente QS21. También puede comprender un aceite en emulsión de agua y tocoferol. CpG no metilado conteniendo oligonucleótidos (WO 96/02555) también son inductores preferenciales de una respuesta TH1 y son adecuados para uso en la presente invención.

25 La preparación de la vacuna de la presente invención puede

ser utilizada para proteger o tratar un mamífero susceptible a infección, a través de medios de la administración de dicha vacuna a través de una ruta sistémica o mucosidad. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de rutas intramusculares, 5 intraperitoneales, intradérmicas o subcutáneas; o a través de administración por mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. De esta forma un aspecto de la presente invención es un método para inmunizar un huésped humano contra una enfermedad causada por infección de una bacteria gram- 10 negativa, cuyo método comprende la administración al huésped de una dosis inmunoprotectora de la preparación OMV de la presente invención.

La cantidad de antígenos en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta 15 inmunoprotectora sin efectos laterales adversos, significativos, en vacunas típicas. Dicha cantidad variaría dependiendo del inmunógeno específico empleado y de cómo se presenta. Generalmente, se espera que cada dosis comprende 1-100 μg del antígeno de proteína o preparación OMV, preferiblemente 5-50 μg y 20 más típicamente en el rango de 5-25 μg .

Una cantidad óptima para una vacuna particular puede ser constatada a través de estudios estándares que involucran la observación de las respuestas inmunes apropiadas en los sujetos. Después de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o 25 varias inmunizaciones de defensa adecuadamente espaciadas.

Las vacunas de la invención son preferiblemente inmunoprotectoras y no tóxicas adecuadas para uso pediátrico y en adolescentes.

Por uso pediátrico se quiere dar a entender el uso en infantes
5 de menos de 4 años de edad.

Por uso inmunoprotector se da a entender que el SBA y/o modelo de protección animal y/o ensayo de bloqueo de adhesión descrito anteriormente son logrados de manera satisfactoria.

Por no tóxico se da a entender que no hay más de un nivel
10 satisfactorio de la actividad de la endotoxina en la vacuna según medido por LAL y ensayos de pirogeneicidad bien conocidos.

Polinucleótidos de la invención

"Polinucleótido" generalmente se refiere a cualquier
15 poliribonucleótido o polidesoxiribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Los "polinucleótidos" incluyen, sin limitación, ADN de estructura de cadena doble e individual que es una mezcla de regiones de estructura de cadena
20 y ARN de estructura de cadena doble e individual y ARN que es una mezcla de regiones de estructura de cadena individual y doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser de estructura de cadena individual, o más típicamente, de estructura de cadena doble o una mezcla de regiones de estructura de cadena individual y doble. Además, "polinucleótido"
25 se refiere a regiones de estructura de cadena triple que comprenden

ARN o ADN o tanto ADN como ARN. El término polinucleótido también incluye ADNs o ARNs que contienen una o más bases modificadas y ADNs o ARNs con ejes modificados para estabilidad u para otras razones. Bases "modificadas" incluye, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inopina. Una variedad de modificaciones se han hecho al ADN y ARN; de esta forma, "polinucleótido" abarca formas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas de polinucleótidos como se encuentran típicamente en la naturaleza, así como las formas químicas de ARN y ADN características de los virus y células. "Polinucleótido" también abarca polinucleótidos relativamente cortos, por lo general referidos como oligonucleótidos.

Otro aspecto de la invención se refiere a una formulación inmunológica/vacuna que comprende uno o más polinucleótidos. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica, ver por ejemplo, Wolff y otros, Science (1990) 247: 1465-8.

Dichas vacunas comprenden uno o más polinucleótidos que codifican una pluralidad de proteínas correspondientes a las combinaciones de proteínas de la invención descritas anteriormente.

La expresión de proteínas de dichos polinucleótidos debería estar bajo el control de un promotor eucariótico capaz de conducir la expresión dentro de una célula de mamífero. El polinucleótido puede adicionalmente comprender una secuencia que codifica otros antígenos. Ejemplos de promotores eucarióticos que podrían conducir la expresión incluyen promotores virales de virus que

codifican promotores adenovirales, promotores retrovirales. Alternativamente, los promotores de mamíferos podrían utilizarse para conducir la expresión.

5 Aspectos adicionales de la invención

Otro aspecto de la invención involucra un método para el tratamiento o prevención de enfermedad Neisserial que comprende la administración de una dosis protectora (o cantidad efectiva) de la vacuna de la invención a un huésped en la necesidad de la misma.

10 Los serogrupos A, B, C, Y o W-135 de *Neisseria meningitidis* y/o infección por *Neisseria gonorrhoeae* podrían ser ventajosamente prevenidos o tratados.

La invención también incluye un uso de la vacuna de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento
15 de prevención de infección Neisserial. Otra vez la infección Neisserial abarca infección mediante los serogrupos A, B, C, Y o W-135 de *Neisseria meningitidis* y/o infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

Otro aspecto de la invención es una cepa Neisserial
20 genéticamente diseñada a partir de la cual una vesícula de membrana exterior de la invención (que tiene por lo menos dos proteínas de la invención recombinantemente reguladas en forma ascendente, como se describió anteriormente) puede ser derivada. Dicha cepas de Neisserial pueden ser *Neisseria meningitidis* o
25 *Neisseria gonorrhoeae*.

La cepa también puede haber sido diseñada (como se describió anteriormente) para regular de manera descendente la expresión de otras proteínas de Neisserial incluyendo la expresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, u ocho de LgtB, LgtE, SiaD, OpC, OpA, PorA, FrpB, msbB y HtrB. Las combinaciones preferidas para la regulación descendente incluyen la regulación descendente (preferiblemente eliminación) de por lo menos LgtB y SiaD, la regulación descendente de por lo menos PorA y OpC, la regulación descendente de por lo menos PorA y OpA, y la regulación descendente de por lo menos PorA, OpA, y OpC.

Los aspectos de la invención son métodos para hacer la composición inmunogénica o vacuna de la invención. Estos incluyen un método que comprende un paso para mezclar juntos por lo menos dos antígenos o proteínas aisladas de Neisseria, las cuales pueden estar presentes en la forma de ampollas derivadas de cepas de Neisserial de la invención, para hacer una composición inmunogénica de la invención, y un método para hacer la vacuna de la invención que comprende un paso para combinar la composición inmunogénica de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

También se incluye en la invención métodos para hacer la composición inmunogénica de la invención que comprende un paso para aislar las vesículas de membrana exterior de la invención de un cultivo de Neisserial. Dicho método puede involucrar un paso adicional de combinar por lo menos dos preparaciones de vesícula de membrana exterior, preferiblemente en donde por lo menos una

preparación de la vesícula de membrana exterior contiene LPS del
 inmunotipo L2 y por lo menos también incluye dichos métodos en
 donde las vesículas de membrana exterior se aíslan a través de la
 extracción con una concentración de DOC de 0-0.5%. Las
 5 concentraciones de DOC de 0.3%-0.5% se utilizan para minimizar el
 contenido de LPS. En las preparaciones OMV en donde LPS se va a
 conservar como un antígeno, las concentraciones DOC de 0-0.3%,
 preferiblemente 0.05%- 0.2%, más preferiblemente de alrededor de
 10% se utilizan para la extracción.

10

Vacunas de célula Entera Fantasma o Aniquiladas

Los inventores consideraron que las mejoras anteriores a las
 preparaciones de ampollas y vacunas pueden ser fácilmente
 extendidas a preparaciones y vacunas de célula completa fantasma o
 15 aniquilada (con ventajas idénticas). Las cepas Gram-negativas de la
 invención a partir de las cuales las preparaciones de ampolla se
 hacen, también se pueden utilizar para hacer preparaciones de
 célula completa fantasma o aniquilada. Los métodos para hacer
 preparaciones fantasma (células vacías con envolturas intactas) de
 20 cepas Gram-negativas son bien conocidos en la técnica (ver por
 ejemplo, WO 92/01791). Los métodos para aniquilar células
 completas para hacer preparaciones de célula inactivadas para uso
 en vacunas también son bien conocidos. Los términos 'preparaciones
 de ampolla' [u OMV] y 'vacunas de ampolla' [u OMV] así como los
 25 procesos descritos a lo largo de este documento son por lo tanto

aplicables a los términos "preparación fantasma" y "vacuna fantasma", y "preparación de célula fantasma" y "vacuna de célula completa aniquilada", respectivamente, para los propósitos de esta invención.

5

Anticuerpos e inmunización pasiva

Otro aspecto de la invención es un método para preparar una globulina inmune para uso en la prevención o tratamiento de infección Neisserial que comprende los pasos de inmunizar un receptor con la vacuna de la invención y aislar la globulina inmune del receptor. Una globulina inmune preparada a través de este método es un aspecto adicional de la invención. Una composición farmacéutica que comprende la globulina inmune de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable es un aspecto adicional de la invención que podría ser utilizado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la enfermedad Neisserial. Un método para el tratamiento o prevención de infección Neisserial que comprende un paso de administración a un paciente de una cantidad efectiva de la preparación farmacéutica de la invención es un aspecto adicional de la invención.

La inoculación de la producción de anticuerpos policlonales se preparar típicamente a través de la dispersión de la composición antigénica en un diluyente fisiológicamente tolerable tal como salina u otros auxiliares adecuados para uso en seres humanos para formar una composición acuosa. Una cantidad inmunoestimuladora se

administra a un mamífero y el mamífero inoculado entonces se mantiene durante un tiempo suficiente para que la composición antigénica induzca anticuerpos protectores.

Los anticuerpos pueden ser aislados a la extensión deseada a través de técnicas bien conocidas tales como cromatografía de afinidad (Harlow y Lane Antibodies; a laboratory manual 1988).

Los anticuerpos pueden incluir preparaciones de suero de una variedad de animales comúnmente utilizados, por ejemplo, cabras, primates, burros, cerdos, caballos, conejillos de India, ratas o el hombre. Los animales son sangrados y se recupera el suero.

Una globulina inmune producida de acuerdo con la presente invención puede incluir anticuerpos completos, fragmentos o subfragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad doble a dos o más antígenos de la invención. Estos también pueden estar formados de F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares incluyendo fragmentos híbridos. Una globulina inmune también incluye proteínas diseñadas de forma natural, sintética o genéticamente que actúan como un anticuerpo a través de la unión a antígenos específicos para formar un complejo.

Una vacuna de la presente invención puede ser administrada a un receptor que entonces actúa como una fuente de globulina inmune, producido en respuesta a un desafío de una vacuna. Un sujeto de esta forma tratado podría donar plasma a partir de la cual

podría ser obtenida la globulina hiperinmune a través de metodología de fraccionamiento de plasma. La globulina hiperinmune podría ser administrada a otro sujeto con el fin de impartir resistencia contra o tratar infección Neisserial. Las globulinas hiperinmunes de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de la enfermedad Neisserial en infantes, individuos comprometidos inmunes, o en donde el tratamiento es requerido y no hay tiempo para que un individuo produzca anticuerpos en respuesta a la vacunación. Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales (o fragmentos del mismo, preferiblemente humanos o humanizados) reactivos contra por lo menos dos constituyentes de la composición inmunogénica de la invención, los cuales podrían ser utilizados para tratar o prevenir infección a través de bacteria Gram negativa, preferiblemente *Neisseria*, más preferiblemente *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* y más preferiblemente el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

Dichas composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos monoclonales que pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos, anticuerpos híbridos con especificidad de dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares incluyendo fragmentos híbridos.

Los métodos para hacer anticuerpos monoclonales son bien

conocidos en la técnica y pueden incluir la fusión de esplenocitos con células de mieloma (Kohler y Milstein 1975 Nature 256; 495; Antibodies-a laboratory manual Harlow and Lane 1988). Alternativamente, los fragmentos Fv monoclonales pueden ser
5 obtenidos a través de la clasificación de una colección de exhibición de fago adecuada (Vaughan TJ y otros 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Los anticuerpos monoclonales pueden ser humanizados o humanizados en parte a través de métodos conocidos.

Todas las referencias o solicitudes de patente citadas dentro
10 de esta especificación de patente se incorporan aquí por referencia.

Los términos "comprendiendo", "comprende" y "abarca" aquí pretenden mediante los inventores ser opcionalmente sustituibles con los términos "consistiendo de", "consiste de", y "abarca", respectivamente, en cada instancia.

15

Método de Aplicación Industrial de la Invención

Los ejemplos siguientes pueden llevarse a cabo utilizando técnicas estándares, las cuales son bien conocidas y son de rutina para aquellos con experiencia en la técnica, excepto cuando por el
20 contrario se describen en detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

25

EJEMPLO 1**Métodos para construir cepas del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* utilizados en preparaciones de vesícula de membrana exterior**

5

WO 01/09350 proporciona métodos detallados para la preparación de vesículas de membrana exterior y para la manipulación de cepas bacterianas a partir de las cuales las vesículas de membrana exterior se derivan. Cuando las vesículas de membrana exterior son para retener lipoproteínas tales como TbpB y/o lipopolisacáridos, los métodos para el aislamiento con bajos niveles o no desoxicolato son preferidos.

10

EJEMPLO 2**Regulación ascendente del antígeno de la proteína Hsf en una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* que carece de genes *cps* funcionales pero expresa PorA**

15

Como se describe en los ejemplos de WO 01/09350, en ciertos países, la presencia de PorA en vesículas de membrana exterior puede ser ventajoso, y puede fortalecer la eficacia de la vacuna de ampollas mejoradas recombinantes. En el siguiente ejemplo, se ha utilizado un vector pCMK(+) modificado para regular de manera ascendente la expresión del antígeno de la proteína Hsf en una cepa que carece de genes *cps* funcionales pero expresa PorA. El vector

20

25

pCMK(+) original contiene un promotor *porA/lacO* quimérico reprimido en *lacI*⁴ expresando el huésped *E. coli* pero transcripcionalmente activo en *Neisseria meningitidis*. En el pCMK(+) modificado, el promotor *porA* nativo fue utilizado para conducir la transcripción del gen *hsf*. El gen que codifica Hsf fue amplificado en PCR utilizando los iniciadores de nucleótido HSF 01-*NdeI* y HSF 02-*NdeI*, presentados en el siguiente cuadro. Debido a la secuencia del iniciador HSF 01-*NdeI* la proteína Hsf expresada contendrá dos residuos de metionina en el extremo 5'. Las condiciones utilizadas par la amplificación PCR fueron aquellas descritas por el proveedor (polimerasa de ADN HiFi, Boehringer Mannheim, GmbH). La permutación cíclica fue la siguiente: 25 veces (94 C 1 min., 48°C 1 min., 72°C 3 min.) y 1 vez (72°C 10 min., 4°C hasta la recuperación). El amplicon correspondiente fue subsecuentemente clonado en los sitios de restricción correspondientes del vector de entrega pCMK(+). En este plásmido recombinante, pCMK(+)-Hsf diseñado, se eliminó el *lacO* presente en el promotor *porA/lacO* quimérico a través de una estrategia PCR recombinante. El plásmido pCMK(+)-Hsf se utilizó como una plantilla para la amplificación PCR de 2 fragmentos de ADN separados:

-fragmento 1 contiene la región recombinogénica *porA* 5', el gen resistente a canamicina y el promotor *porA*. Los iniciadores de oligonucleótido utilizados, RP1(*SacII*) y RP2, se presentan en el siguiente Cuadro 2. El iniciador RP1 es homólogo a la secuencia justo en la corriente ascendente del operador *lac*.

-fragmento 2 contiene la secuencia Shine-Dalgarno del gen *porA*, el gen *hsf* y la región recombinogénica A 3'. Los iniciadores del oligonucleótido utilizados, RP3 y RP4(*Apal*), se presentan en el cuadro siguiente. El iniciador RP3 es homólogo a la secuencia simplemente en corriente descendente del operador *lac*. El extremo 3' del fragmento 1 y el extremo 5' del fragmento 2 tienen 48 bases traslapadas. Se utilizaron 500 ng de cada PCR (1 y 2) para una reacción de PCR final utilizando los iniciadores RP1 y RP4. El amplicón final obtenido se subclonó en el vector pSL1180 restringido con *SacII* y *Apal*. El plásmido modificado pCMK(+)-Hsf se purificó a una gran escala utilizando el equipo QIAGEN maxiprep y 2 µg de este material se utilizó para transformar una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* que carece de genes *cps* funcionales. Con el fin de conservar la expresión de *porA*, la integración resultante de un cruzamiento individual se seleccionó a través de una combinación de PCR y procedimientos de clasificación de tinción Western. Los clones resistentes a canamicina se probaron como positivos a través de PCR específico de *porA* y la tinción Western se almacenó a -70°C como existencias de glicerol y se utilizaron para estudios adicionales. La bacteria (correspondiente a alrededor de $5 \cdot 10^8$ bacterias) se volvió a suspender en 50 µl de regulador de pH SDS-PAGE, se congeló (-20°C) / hirvió (100°C) tres veces y después se separó a través de electroforesis PAGE-SDS en un gel al 12.5%. La expresión de Hsf se examinó en lisatos bacterianos de célula completa (WCBL) derivados de NmB [Cps-,

PorA+] o *NmB* [Cps-, PorA+, Hsf+]. La tinción coomassie detectó un incremento importante en la expresión de Hsf (con respecto al nivel de Hsf endógeno). Estos resultados confirman que el vector pCMK(+)-Hsf modificado es funcional y puede ser utilizado exitosamente para regular en forma ascendente la expresión de las proteínas de membrana exterior, sin abolir la producción del antígeno de proteína de membrana exterior PorA principal.

Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

	Oligonucleótidos	<u>Secuencia</u>	Comentario(s)
10	Hsf 01-Nde	5'-GGA ATT CCA TAT GAT GAA CAA AAT ATA CCG C-3'	Sitio de clonación <i>NdeI</i>
	Hsf 02-Nhe	5'-GTA GCT AGC TAG CTT ACC ACT GAT AAC CGA C-3'	Sitio de clonación <i>NheI</i>
15	GFP-mut-Asn	5'-AAC TGC AGA ATT AAT ATG AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3	Sitio de clonación <i>AsnI</i> Compatible con <i>NdeI</i>
	GFP-Spe	5'-GAC ATA CTA GTT TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG-3'	Sitio de clonación <i>SpeI</i> Compatible con <i>NheI</i>
20	RP1 (SacII)	5'-TCC CCG CGG GCC GTC TGA ATA CAT CCC GTC-3'	Sitio de clonación <i>SacII</i>
	RP2	5'-CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG TCT TCA-3'	
25	RP3	5'-AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC TCA AAT TTA CAA AAG GAA GCC CAT ATG-3'	
	RP4 (ApaI)	5'-GGG TAT TCC GGG CCC TTC AGA CGG CGC AGC AGG-3'	Sitio de clonación <i>ApaI</i>

EJEMPLO 3**Regulación ascendente del gen *tbpA* del serogrupo B de *N. meningitidis* mediante el reemplazo del promotor**

5 El propósito del experimento fue reemplazar la región promotora endógena del gen *tbpA* por un promotor *porA*, con el fin de regular en forma ascendente la producción del antígeno TbpA. Para ese propósito, un plásmido de reemplazo del promotor fue construido utilizando metodologías de clonación de *E. coli*. La región de ADN

10 (731bp) localizada en corriente ascendente a partir de la secuencia de codificación *tbpA* se descubrió en la base de datos Incyte PathoSeq privada de la cepa ATCC 13090 de *Neisseria meningitidis*. Este ADN contiene la secuencia de codificación para el antígeno TbpB. Los genes se organizaron en un operón. El gen *tbpB* será

15 eliminado y reemplazado por el casete promotor *CmR/porA*. Para ese propósito, un fragmento de ADN de 3218bp correspondiente a la región de flanco 5' 509bp del gen *tbpB*, la secuencia de codificación *tbpB* 2139bp, la secuencia intergénica 87bp y los primeros 483 nucleótidos de la secuencia de codificación *tbpA* se

20 amplificaron a través de PCR a partir del ADN genómico del serotipo B de *Neisseria meningitidis* utilizando los oligonucleótidos BAD16 (5'-GGC CTA GCT AGC CGT CTG AAG CGA TTA "GAG TTT CAA AAT TTA TTC-3') y BAD17 (5'-GGC CAA GCT ICA GAC GGC GTT CGA CCG AGT TTG AGC CTT TGC- 3') conteniendo las secuencias

25 aplicadas y los sitios de restricción *NheI* y *HindI* (subrayados). Este

fragmento de PCR se purificó con un Equipo High Pure (Boehringer Mannheim, Alemania), y se clonó directamente en un vector pGemT (Promega, EUA). Este plásmido se sometió a mutagénesis PCR de círculo (Jones & Winistofer (1992)) con el fin de (i) insertar los sitios de restricción adecuados permitiendo la clonación de un casete promotor *CmR/PorA* y (ii) eliminar 209bp de la secuencia de flanco 5' de *tbpB* y la secuencia de codificación *tbpB*. La PCR de círculo se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos BAD 18 (5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') y el BAD 19 (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G-3') conteniendo los sitios de restricción adecuados *XmaI*, *BglII* y *Soy* (subrayados). El casete promotor *Cmr/PorA* se amplificó a partir del plásmido pUC D15/Imp85 previamente descrito, utilizando los iniciadores BAD 21 (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') y BAD20 (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') conteniendo los sitios de restricción adecuados *XmaI*, *SpeI*, *BglII* y *Soy* (subrayados). Este fragmento de PCR se clonó en el plásmido PCR de círculo. Este plásmido se utilizará para transformar las cepas B [*cps*-] y [*cps-porA*] del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. La integración a través del cruzamiento doble en la región en corriente ascendente de *tbpA* dirigirá la inserción del promotor *porA* directamente en corriente ascendente del ATG *tbpA*.

EJEMPLO 4**Construcción de una cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*
regulada en forma ascendente para la expresión de dos
antígenos: TbpA y Hsf**

5

El propósito del experimento fue regular en forma ascendente la expresión de TbpA y Hsf simultáneamente en la misma cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*. La producción de TbpA se reguló en forma ascendente reemplazando su región promotora endógena a través del promotor *porA* fuerte (reemplazo del promotor). En este contexto, el gen *tbpB*, localizado en corriente ascendente de *tbpA* se eliminó, y la proteína TbpB ya no está presente en la membrana exterior. La expresión de Hsf se reguló de forma ascendente a través de la inserción (recombinación homóloga) de una segunda copia del gen correspondiente en el sitio *porA* (entrega del gen). Ambas cepas han sido descritas en una patente separada referido como en WO 01/09350. Los marcadores de selección utilizados en ambas estrategias (Cm^R y Kam^R) permitieron la combinación de ambas integraciones dentro del mismo cromosoma.

20 El ADN genómico total fue extraído de la cepa Nm.B *cps*-/*TbpA*+/*PorA*+ recombinante a través del protocolo tip 500-G de Qiagen Genomic. Se restringieron 10 µg de ADN o/n con la enzima de restricción *DraIII* y se utilizaron para transformar el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* a través del protocolo de transformación clásico. Las células utilizadas para la transformación fueron

25

cualquier *Nm.B cps-/Hsf+/PorA+* recombinante (recombinación homóloga a través de un cruzamiento dentro del sitio *porA*) o *NmB cps-/Hsf+/PorA+* recombinante (Intercambio alélico/recombinación homóloga a través de 2 cruzamientos dentro del sitio *porA*). Estos se

5 colocaron en placas durante la noche en agar GC conteniendo 200 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina, diluido a $\text{DO}_{650}=0.1$ en medio líquido GC 10 mM de MgCl_2 , y se incubaron durante 6 horas a 37°C bajo agitación vigorosa con 10 μg de ADN genómico restringido *DraIII*. La *Neisseria meningitidis* recombinante resultante de un cruzamiento doble sobre

10 a través del evento (clasificación PCR) se seleccionó en medio GC conteniendo 200 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina y 5 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y se analizó para la expresión de TbpA y Hsf en preparaciones OMV. Como se representa en la Figura 1, la producción de ambas, TbpA y Hsf fue significativamente incrementada en el OMV preparado de la

15 cepa *NmB* recombinante de TbpA/Hsf cuando se comparó con el OMV preparado de las cepas *NmB cps* de control. El nivel de la sobre expresión de cada proteína en la recombinante doble es comparable con el nivel de la expresión obtenida en los recombinantes individuales correspondientes. El nivel de la sobre expresión de

20 TbpA y Hsf fue comparable en las cepas *PorA+* y *PorA-* (datos no mostrados). Todos juntos, estos datos demostraron que: (i) la expresión de TbpA y Hsf puede ser conjuntamente y concomitantemente regulada en forma ascendente dentro de *N. meningitidis* y (ii) las ampollas recombinantes enriquecidas para

25 TbpA y Hsf pueden ser obtenidas y utilizadas para inmunización.

EJEMPLO 5**Construcción de una cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*
regulada en forma ascendente para la expresión de dos
antígenos: TbpA y NspA**

5

El propósito del experimento fue regular en forma ascendente la expresión de TbpA y NspA simultáneamente en la misma cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*. La producción de TbpA se reguló en forma ascendente reemplazando su región promotora endógena a través del promotor *porA* fuerte (reemplazo del promotor). La expresión de NspA se reguló de forma ascendente a través de la inserción (recombinación homóloga) de una segunda copia del gen correspondiente en el sitio *porA* (entrega del gen). Ambas cepas individuales han sido descritas en una patente separada WO 01/09350. Los marcadores de selección utilizados en ambas estrategias (Cm^R o Kan^R) permitieron la combinación de ambas integraciones dentro del mismo cromosoma. El ADN genómico total fue extraído de la cepa *NmB cps-/TbpA+/PorA+* recombinante a través del protocolo tip 500-G de Qiagen Genomic. Se restringieron 10 μg de ADN o/n con la enzima de restricción *A*tall y se utilizaron para transformar el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* a través del protocolo de transformación clásico. Las células utilizadas para la transformación fueron cualquier *NmB cps-/NspA+/PorA-* recombinante. Estas se colocaron en placas durante la noche en agar GC conteniendo 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de canamicina, diluido a $\text{DO}_{650}=0.1$ en

medio líquido GC 10 mM de $MgCl_2$, y se incubaron durante 6 horas a 37°C bajo agitación vigorosa con 10 µg de ADN genómico restringido AatIII. La *Neisseria meningitidis* recombinante resultante de un cruzamiento doble a través del evento (clasificación PCR) se
 5 seleccionó en medio GC conteniendo 200 µg/ml de canamicina y 5 µg/ml de cloranfenicol y se analizó para la expresión de TbpA y NspA en preparaciones OMV. La producción de ambas, TbpA y NspA fue significativamente incrementada en el OMV preparado de la cepa NmB recombinante de TbpA/NspA cuando se comparó con el OMV
 10 preparado de las cepas NmB cps de control. El nivel de la sobre expresión de cada proteína en la recombinante doble es comparable con el nivel de la expresión obtenida en los recombinantes individuales correspondientes. Todos juntos, estos datos demostraron que: (i) la expresión de TbpA y NspA puede ser
 15 conjuntamente y concomitantemente regulada en forma ascendente dentro de *N. meningitidis* y (ii) las ampollas recombinantes enriquecidas para TbpA y Hsf pueden ser obtenidas y utilizadas para inmunización.

20

EJEMPLO 6

Construcción de una cepa del serogrupo B de *N. meningitidis* regulada en forma ascendente para la expresión de dos antígenos: NspA y D15/Omp85

25

El propósito del experimento fue regular en forma ascendente

la expresión de NspA y D15/Omp85 simultáneamente en la misma cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*. La producción de D15/Omp85 se reguló en forma ascendente reemplazando su región promotora endógena a través del promotor *porA* fuerte (reemplazo del promotor). La expresión de NspA se reguló de forma ascendente a través de la inserción (recombinación homóloga) de una segunda copia del gen correspondiente en el sitio *porA* (entrega del gen). Ambas cepas han sido descritas en una patente separada WO 01/09350. Los marcadores de selección utilizados en ambas estrategias (Cm^R o Kan^R) permitieron la combinación de ambas integraciones dentro del mismo cromosoma.

El ADN genómico total fue extraído de la cepa NmB *cps*-/D15/Omp85/PorA+ recombinante a través del protocolo tip 500-G de Qiagen Genomic. Se restringieron 10 µg de ADN o/n con la enzima de restricción *AatII* y se utilizaron para transformar el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* a través del protocolo de transformación clásico. Las células utilizadas para la transformación fueron cualquier NmB *cps*-/NspA+/PorA- recombinantes. Estas se colocaron en placas o/n sobre agar GC conteniendo 200 µg/ml de canamicina, diluido a DO₆₅₀=0.1 en medio líquido GC 10 mM de MgCl₂, y se incubaron durante 6 horas a 37°C bajo agitación vigorosa con 10 µg de ADN genómico restringido *AatII*. La *Neisseria meningitidis* recombinante resultante de un cruzamiento doble a través del evento (clasificación PCR) se seleccionó en medio GC conteniendo 200 µg/ml de canamicina y 5 µg/ml de cloranfenicol y se analizó para la

expresión de NspA y D15/Omp85 en preparaciones OMV. La producción de ambas, NspA y D15/Omp85 fue significativamente incrementada en el OMV preparado de la cepa *NmB* recombinante de NspA/D15-Omp85 cuando se comparó con el OMV preparado de las
 5 cepas *NmB cps* de control. El nivel de la sobre expresión de cada proteína en la recombinante doble es comparable con el nivel de la expresión obtenida en los recombinantes individuales correspondientes. Todos juntos, estos datos demostraron que: (i) la expresión de NspA y Omp85 puede ser conjuntamente y
 10 concomitantemente regulada en forma ascendente dentro de *N. meningitidis* y (ii) las ampollas recombinantes enriquecidas para NspA y Omp85 pueden ser obtenidas y utilizadas para inmunización

EJEMPLO 7

15 Producción y purificación de formas Hsf recombinantes en *E. coli*

El análisis de computadora de la proteína de tipo Hsf de *Neisseria meningitidis* reveló por lo menos cuatro dominios estructurales. Considerando que la secuencia Hsf de la cepa H44/76
 20 como una referencia, el Dominio 1, que comprende los aminoácidos 1-51, codifica un péptido de señal dependiente de sec característico de la familia auto-transportadora, el Dominio 2, comprendiendo los aminoácidos 52 a 473, codifica el dominio pasajero probablemente para estar expuesto en la superficie y accesible al sistema inmune,
 25 el Dominio 3, comprendiendo los aminoácidos 474 a 534, codifica un dominio enrollado-espiral putativo requerido para la oligomerización

de la proteína y una bisagra (cuello), el Dominio 4, comprendiendo los residuos 535 del término C, se pronostica que codifica estructuras de cadena beta probablemente dentro de la estructura de tipo barril y que van a ser ancladas dentro de la membrana exterior (Henderson y otros (1998), Trends Microbiol. 6: 370-378 ; Hoiczky y otros, (2000), EMBO 22: 5989-5999). Ya que los dominios 2 y 3 probablemente van a estar expuestos en la superficie, están bien conservados (más de 80% en todas cepas probadas, como se describe en Pizza et al. (2000), Science 287: 1816-1820), representan interesantes candidatos de vacuna. Para ese propósito, el dominio 2 (referido como un dominio pasajero Hsf) y el dominio 2 + 3 (referido como un cuello Hsf + dominio de enrollado-espiral) fueron expresados en y purificados de *E. coli*. Los fragmentos de ADN que codifican los aminoácidos 52-473 (Hsf pasajero) y 52-534 (Hsf n+cc) fueron amplificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos que agregan los sitios de restricción *RcaI* terminal (iniciador hacia delante) y *XhoI* (iniciador en reversa). Los amplicones purificados fueron digeridos con *RcaI/XhoI* en las condiciones recomendadas por el proveedor, y fueron subsecuentemente clonados en los sitios *NcoI* (compatible con *real*) / *XhoI* del vector de expresión de *E. coli* pET24d (Novagen, Inc. Madison WI). Los plásmidos recombinantes fueron seleccionados y utilizados para preparar plásmidos recombinantes purificados. Para el estudio de expresión, estos vectores (pET-Hsf pas & pET-Hsf ncc) fueron introducidos dentro de la cepa B121DE3 de *Escherichia coli*

(Novagen), en la cual, el gen para la polimerasa T7 se colocó bajo el control del promotor *lac* regulable de tiogalactosida (IPTG) de isopropil-beta-D. Los cultivos líquidos (700 ml) de la cepa recombinante de *E. coli* Novablue (DE3) [pET-24b/BASB029] se
5 hicieron crecer a 37°C bajo agitación hasta que se alcanzó la densidad óptica de 600 nm (OD600). En ese punto del tiempo, se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM, y el cultivo se hizo crecer durante 4 horas más. El cultivo después se centrifugó a 10,000 rpm y la pella se congeló a -20°C durante por lo menos 10
10 horas. Después de descongelar, la pella (680 ml del cultivo) se volvió a suspender durante 30 minutos a 22°C en 20 mM de regulador de pH de fosfato pH 7.0 antes de la lisis de las células a través de dos pasadas a través de un desestabilizador Rannie. Las células lisadas se formaron en pellas 30 minutos a 15,000 rpm
15 (centrifugadora Beckman J2-HS, rotor JA-20) a 4°C. El sobrenadante se cargó en una columna de flujo rápido de Q-Sepharose (Pharmacia) equilibrada con 20 mM de regulador de pH de Tris-HCl pH 8.0. Después de la pasada del flujo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de 20 mM de Tris-regulador de pH de HCl pH 8.0. La
20 proteína recombinante se eluyó a partir de la columna a través de 250 mM de NaCl en 20 mM de Tris-regulador de pH de HCl pH 8.0. Las fracciones positivas del antígeno se agruparon y se dializaron durante la noche contra 20 mM de regulador de fosfato pH 7.0, 0.5 M de NaCl y se agregaron 20 mM de Imidazol a la muestra dializada. La
25 muestra después se amplificó sobre una columna de Agarosa Ni-NTA

(Qiagen) equilibrada con 20 mM de regulador de pH de fosfato pH 7.0
 conteniendo 500 mM de NaCl y 20 mM de Imidazol. Después de la
 pasada del flujo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de
 20 mM de regulador de pH de fosfato pH 7.0 conteniendo 500 mM de
 5 NaCl y 20 mM de Imidazol. Los contaminantes se eluyeron a través
 de 100 mM de Imidazol en 20 mM de regulador de pH de fosfato pH
 7.0. La proteína recombinante se eluyó a partir de la columna a
 través de 250 mM de Imidazol en 20 mM de regulador de pH de
 fosfato, pH 7.0. Las fracciones positivas del antígeno se agruparon y
 10 se dializaron contra 10 mM de regulador de pH de fosfato pH 6.8
 conteniendo 150 mM de NaCl. Como se muestra en la Figura 2, una
 proteína pasajera de tipo Hsf enriquecida (pureza estimada en más
 de 90% pura en SDS-PAGE teñida con CBB), migrando a alrededor
 de 47 kDa (masa molecular relativa estimada) se eluyó de la
 15 columna. Este polipéptido fue reactivo contra un anticuerpo
 monoclonal de ratón producido contra el motivo 5-histidina. Tomados
 juntos, estos datos indican que ambos genes, Hsf pasajero y Hsf ncc
 pueden ser expresados y purificados bajo una forma recombinante en
E. coli.

20

EJEMPLO 8

Producción y purificación de Hap pasajero recombinante en *E. coli*

25 El análisis de computadora de la proteína de tipo Hap de

Neisseria meningitidis reveló por lo menos tres dominios estructurales. Considerando que la secuencia Hap de la cepa H44/76 como una referencia, el Dominio 1, que comprende los aminoácidos 1-42, codifica un péptido de señal dependiente de sec característico de la familia auto-transportadora, el Dominio 2, comprendiendo los aminoácidos 43 a 950, codifica el dominio pasajero probablemente para estar expuesto en la superficie y accesible al sistema inmune, el Dominio 3, comprendiendo los 951 residuos del término C (1457), se pronostica que codifica estructuras de cadena beta probablemente dentro de la estructura de tipo barril y que van a ser ancladas dentro de la membrana exterior. Ya que el dominio 2 probablemente va a estar expuesto en la superficie, está bien conservados (más de 80% en todas cepas probadas) y podría ser producido como antígenos de subunidad en *E. coli*., representa interesantes candidatos de vacuna.

Ya que los dominios 2 y 3 probablemente van a estar expuestos en la superficie, están bien conservados (más de 80% en todas cepas probadas, como se describe en Pizza et al. (2000), Science 287: 1816-1820), representan interesantes candidatos de vacuna. Para ese propósito, el dominio 2 (referido como un dominio pasajero Hap fue expresado en y purificado a partir de *E. coli*). Un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 43-950 (Hap pasajero) se amplificó mediante PCR utilizando oligonucleótidos que agregan los sitios de restricción *NcoI* terminal (iniciador hacia delante) y *XhoI* (iniciador en reversa). Los amplicones purificados fueron digeridos con *NcoI/XhoI* en las condiciones recomendadas por el proveedor, y

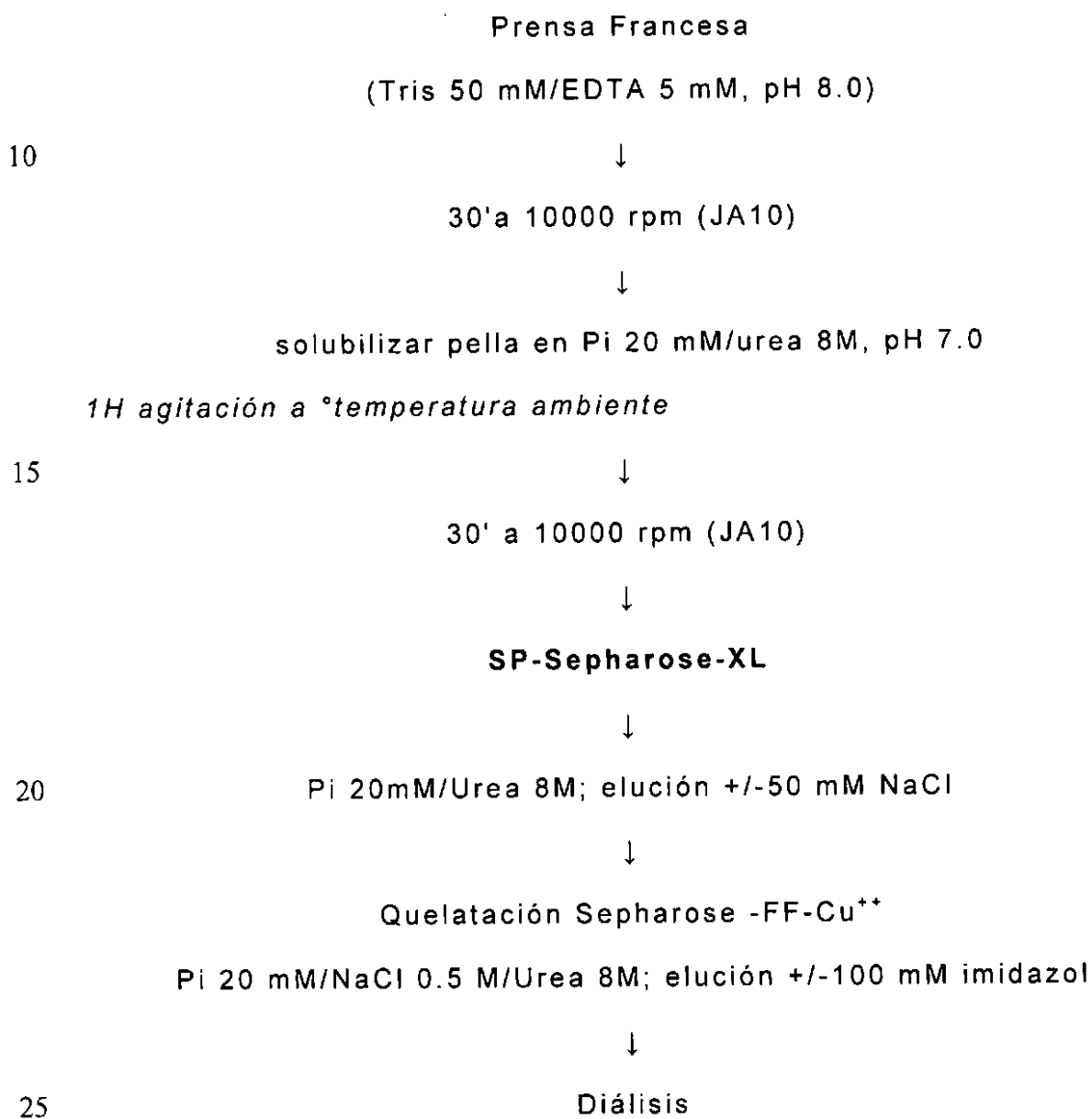
fueron subsecuentemente clonados en los sitios *NcoI* / *XhoI* del vector de expresión de *E. coli* pET24d (Novagen, Inc. Madison WI). Los plásmidos recombinantes fueron seleccionados y purificados a gran escala. Para el estudio de expresión, estos vectores (pET-Hap pass) fueron introducidos dentro de la cepa B121DE3 de *Escherichia coli* (Novagen), en la cual, el gen para la polimerasa T7 se colocó bajo el control del promotor *lac* regulable de tiogalactosida (IPTG) de isopropil-beta-D.

10 **Cultivo de *E. coli* BL21[pET-Hap pass] en fermentador.** Una fracción de alícuota (100 μ l) de la semilla maestra se difundió en placas FEC013AA (peptona de soja A3 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, Agar 18 g/l, H₂O destilada hasta 1 l), y se dejó crecer durante 20 horas a 37°C. El césped de bacteria se cosechó y se
15 volvió a suspender en agua estéril conteniendo NaCl 0.9%. Esta solución se utilizó para inocular un fermentador de 20 l utilizado en el modo de lotes en medio FEC011AC (Peptona de soja 24 g/l, extracto de levadura 48 g/l, MgSO₄/7H₂O 0.5 g/l, K₂HPO₄/2H₂O 0.45 g/l, glicerol (87%) 40 g, y H₂O destilada hasta 1 l). Temperatura
20 (30°C), pH 6.8, NaOH 25%/H₃PO₄ 25%), presión (500 mbarias), se mantuvo constante y la aeración se fijó a 20 l/minuto. En estas condiciones la presión del oxígeno disuelto se mantuvo a 20% activando la agitación (100 a 1000 rpm). El Inductor (IPTG, 1 mM) se agregó después de 8 horas de crecimiento (OD = 27.8). Las Muestras
25 (6 l) se recolectaron después de 6 horas (OD = 49.2) y 10H30 (OD =

48.6), la biomasa se cosechó a través de centrifugación y la pellas correspondientes se almacenaron a -20°C .

Purificación del Hap pasajero:

- 5 El HAP pasajero se purificó de un fermentador en el modo por lotes. Se desarrolló un esquema de purificación (ver a continuación):



(PBS pH 6.8/arginina 0.5 M)



filtración estéril

5 La mayoría del Hap pasajero se recuperó en la pella de centrifugación después de la ruptura de las células. La solubilización fue hecha posible a través de 8 M de urea. A pesar de que el término N de His-cola, IMAC no fue operativo como en el primer paso, pero estuvo bien después de un primer paso en intercambiador de catión
10 SP-XL. En este SP-Sepharose-XL, la proteína se eluyó cuantitativamente en la mitad del gradiente NaCl lineal (0-250 mM). IMAC se hizo con Quelatación Sepharose cargado en Cu^{++} , como para FHAb. Esta vez, contrario a FHAb, IMAC mostró un factor de purificación importante. En SDS-PGE, HAP2/3 parece puro después
15 de IMAC. El pico HAP2/3 fue sin embargo muy amplio en 0-200 mM de gradiente de imidazol, por lo que se trató la elución a través de los pasos de imidazol (10 mM -100 mM); el modo de gradiente parece sin embargo más eficiente en términos de pureza. Como paso final, se trató el intercambio de regulador de pH de urea a arginina a
20 través de permeación de gel sin embargo en este caso la proteína se eluyó en dos picos. Estos dos picos mostraron un perfil comparable en SDS-PAGE; por lo que se puede hipotetizar que es debido a un redoblamiento parcial del HAP pasajero. Cuando se regresó a la diálisis clásica como paso final par el intercambio de regulador de
25 pH. El análisis SDS-PAGE mostró una buena pureza del material final

(ver Figura 3). La pureza del HAP pasajero además se confirmó a través de WB anti-his. Se reconoce a través de anti-*E.coli*. Se encontró un peso molecular de 96.1 KD.

5

EJEMPLO 9

Producción y purificación de formas FrpA/C recombinantes en *E. coli*

Neisseria meningitidis codifica dos proteínas RTX, referidas
 10 como FrpA y FrpC secretadas dependiendo de la limitación de hierro
 (Thompson y otros, (1993) J. Bacteriol. 175: 811-818; Thompson y
 otros, (1993) Infect. Immun. 61: 2906-2911). La familia de proteína
 RTX (Repetición de toxina) tiene en común series de 9 aminoácidos
 repetidos cerca de su término C con los consensos: Leu Xaa Gly Gly
 15 Xaa Gly (Asn/Asp) AspXaa. (LXGGXGN/D₀DX). Las repeticiones en *E.*
coli HlyA se cree que son el sitio de la unión de Ca²⁺. Como se
 representa en la Figura 4, las proteínas FrpA y FrpC
 meningocócicas, según caracterizadas en la cepa FAM20, comparten
 una similitud de aminoácido extensiva en sus regiones central y C-
 20 terminal pero similitud muy limitada (si hay alguna) en el término N.
 Además, la región conservada entre FrpA y FrpC exhiben algo de
 polimorfismo debido a la repetición (13 veces en FrpA y 43 veces en
 FrpC) de un motivo de aminoácido 9. Para evaluar el potencial de la
 vacuna de FrpA y FrpC, se reprodujeron recombinantemente en
 25 regiones de proteína de *E. coli* conservadas entre FrpA y FrpC. Para

ese propósito, un segmento de ADN cubriendo los aminoácidos 277 a 1007 (con respecto a la secuencia de péptido FAM20 de *N. meningitidis*) se amplificaron mediante PCR a partir del genoma H44/76 del serogrupo B de *N. meningitidis* utilizando el iniciador hacia delante FrpA-19 (5'-CTCGAGACCATGGGCAAATATCATGTCTACGACCCCCTCGC-3') y el iniciador en reversa FrpA-18 (3'-GTG CATAGTGTCAGAGTTTTTGTGCGACGTCGTAATTATAGACC-3'). Tres amplicones de aproximadamente 1530 bp respectivamente (3 repeticiones), aproximadamente 2130 bp (13 repeticiones) y 2732 bp (23 repeticiones) se obtuvieron y se digirieron con endonucleasas de restricción *NcoI* y *SaII*. Estos fragmentos después fueron insertados en los sitios *NcoI/XhoI* (compatible con *SaII*) de pET24d y plásmidos recombinantes (pET-Frp3, pET-Frp13 y pET-Frp23 respectivamente) se seleccionaron y se utilizaron para transformar células BL21DE3 de *E. coli*. Como se representa en la Figura 5, los tres dominios conservados FrpA/C recombinantes producidos de construcciones dependen de la inducción. Además, la incrementar el número de repeticiones se incrementa la solubilidad de la proteína recombinante, según determinado por el análisis de fragmentación de célula (datos no mostrados).

Purificación del dominio conservado FrpA/C conteniendo 23 repeticiones del nonapéptido LXGGXGC/DDX (911 aa en total): 3.5 litros de *E. coli* B121DE3 [pET- Frp23] se cultivaron y se indujeron durante 4 horas a través de la adición de 2 mM de IPTG cuando se

alcanzó un OD de 0.6. La célula se cosechó a través de centrifugación y la pella correspondiente se desestabilizó con presión, se clarificó a través de centrifugación y el sobrenadante de cultivo correspondiente se cargó en una columna de afinidad de ión de metal Ni²⁺ (Ni-NTA-agarosa, Qiagen GmbH). Se utilizó Imidazol (5) para la elución y finalmente se removió a través de diálisis extensiva contra 10 mM de fosfato de Na pH 6.8, 150 mM de NaCl.

EJEMPLO 10

10 Producción y purificación de formas FHA recombinantes en *E. coli*

Clonación de un FhaB truncado de *N. meningitidis*

Se extrajo ADN genómico de 10¹⁰ células de la cepa H44/76 del serogrupo B de *N. meningitidis* utilizando el equipo de extracción de ADN genómico QIAGEN (Qiagen GmbH). Este material (1 µg) después se sometió a amplificación de ADN de Reacción de Cadena de Polimerasa utilizando los siguientes iniciadores específicos del gen FhaB: JKP: 5'AAT GGA ATA CAT ATG AAT AAA GGT TTA CAT CGC ATT ATC3' y 57JKP 5' CCA ACT AGT GTT TTT CGC TAC TTG GAG CTG T3'. Un fragmento de ADN de aproximadamente 4200 bp, codificando los primeros 1433 aminoácidos N-terminal de la proteína, se obtuvieron, se digirieron a través de endonucleasas de restricción *NdeI/Spel* y se insertaron dentro de los sitios correspondientes de pMG MCS (derivado pMG, Proc Natl Acad Sci Usa Enero 1985; 25

82(1):88-92) utilizando técnicas de biología molecular estándar (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Segunda Edición, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). La secuencia de ADN del fragmento FhaB clonado se determinó
 5 utilizando el equipo de Secuenciación Big Dye Cycle (Perkin-Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM (ver Figura 1). El plásmido pMG-FhaB recombinante (1 µg) después fue sometido a amplificación de ADN de Reacción de Cadena de Polimerasa utilizando los iniciadores específicos FhaB
 10 (XJKP035'AATGGAATACATATGAATAAAGGTTTACATCGCATTATCTTT AG3' y XJKP57025'GGGGCCACTCGAGGTTTTTCGCTACTTGGA GCTGTTTCAGATAGG3'). Un fragmento de ADN de 4214 bp se obtuvo, se digirió a través de endonucleasas de restricción *NdeI/XhoI* y se insertó dentro de los sitios correspondientes del vector de
 15 expresión/clonación pET-24b (Novagen) usando técnicas de biología molecular (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Segunda Edición, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). La secuenciación confirmatoria del pET-24b recombinante conteniendo FhaB truncado (pET23b/FhaB2/3) se llevó
 20 a cabo utilizando el equipo Big Dyes (Applied biosystems) y el análisis en un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el proveedor. La secuencia de nucleótido resultante se presenta en la Figura 6.

Expresión y purificación de la proteína FhaB recombinante en *Escherichia coli*.

La construcción del vector de expresión/clonación pET24b/FhaB2/3 se describe anteriormente. Este vector contiene el gen FhaB truncado aislado de la cepa H44/76 fusión con un tramo de 6 residuos de Histidina (en el término C del producto recombinante), colocado bajo el control del promotor 10 del gen T7 bacteriófago fuerte. Para el estudio de expresión, este vector se introdujo en la cepa de *Escherichia coli* Novablue (DE3) (Novagen), en la cual el gen para la polimerasa T7 se colocó bajo el control del promotor *lac* regulable a través de tiogalactosida de isopropil-beta-D (IPTG). Los cultivos líquidos (100 ml) de la cepa recombinante de *E. coli* Novablue (DE3) [pET24b/FhaB2/3] se hicieron crecer a 37°C bajo agitación hasta que se alcanzó la densidad óptica a 600 nm (OD600). En ese punto del tiempo, se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM, y el cultivo se hizo crecer durante 4 horas más. El cultivo después se centrifugó a 10,000 rpm y la pella se congeló a -20°C durante por lo menos 10 horas. Después de descongelar, la pella se volvió a suspender durante 30 minutos a 22°C en regulador de pH (6M de clorhidrato de guanidina, 0.1 de NaH₂PO₄, 0.01 M de Tris, pH 8.0) se pasaron tres veces a través de una aguja y se purificaron a través de centrifugación (20000 rpm, 15 minutos). La muestra después se cargó a una velocidad de flujo de 1 ml/minuto en una columna Hitrap cargada con Ni²⁺ (Pharmacia Biotech). Después de la pasada del flujo, la columna se lavó con 40 ml de regulador de pH B

(8M de urea, 0.1M de NaH_2PO_4 , 0.01M Tris, pH 8.0), 40ml de regulador de pH C (8M Urea, 0.1M de NaH_2PO_4 , 0.01M Tris, pH 6.3). La proteína recombinante FhaB/3/His6 después se eluyó a partir de la columna con 30 ml de regulador de pH D (8N de urea, 0.1M de NaH_2PO_4 , 0.01M Tris, pH 6.3) conteniendo 500 mM de imidazol y se recolectaron fracciones con un tamaño de 3 ml. Como se presenta en la Figura 7, una proteína FhaB-2/3/His6 altamente enriquecida, que migra alrededor de 154 kDa (masa molecular relativa estimada), se eluyó de la columna. Este polipéptido fue reactivo contra un anticuerpo monoclonal de ratón surgido contra el motivo de histidina 5. Tomados juntos, estos datos indican que Fhab/2/3 pueden ser expresados y purificados bajo una forma recombinante en *E. coli*.

Inmunización de ratones con FhaB2/3His recombinante

La proteína FhaB2/3/His6 recombinante parcialmente purificada expresada en *E. coli* se inyectó tres veces en ratones Balb/C en los días 0, 14, y 29 (10 animales/grupo). Los animales se inyectaron mediante ruta subcutánea con alrededor de 5 μg de AlPO_4 , o formulado en emulsión SBAS2 (emulsión de SBAS2 conteniendo 5 μg de MPL y 5 μg de QS21 por dosis). Un grupo de control negativo consisting de ratones inmunizados con la emulsión SBAS2 solamente también se agregó al experimento. Los ratones se sangraron en el día 29 (15 días Post II) y el día 35 (6 días Post III) con el fin de detectar anticuerpos anti-FhaB específicos. Los anticuerpos anti-FhaB específicos se midieron en suero combinado

(de 10 ratones/grupo) a través de ELISA en FhaB2/3/his recombinante purificado.

EJEMPLO 11

5 Actividades de bloqueo de adhesión de suero de ratón y conejo contra los antígenos FHA, Hap y Hsf

Las proteínas homólogas a la meningocócica de tipo FHAB, de tipo Hsf y tipo Hab han sido descritas previamente como siendo
10 determinantes virulentos importantes y para mediar la adhesión bacterial de *Bordetella pertussis* (FHA) y *Haemophilus influenzae* (Hap y Hsf). La adhesión a células epiteliales y endoteliales se sabe que es crucial para la colonización de los nasofaríngeos y el cruce de la barrera de sangre-cerebro mediante los meningococos. De esta
15 manera la interferencia con la adhesión de *N. meningitidis* representa un método valioso para controlar la colonización e infección meningocócica. Aquí se probó si el anti-suero dirigido contra los antígenos FHAB 2/3° meningocócico, de tipo Hap y de tipo Hsf fue capaz de interferir la adhesión de *Neisseria meningitidis* a
20 células endoteliales. Se utilizó el siguiente procedimiento experimental.

Inhibición de adhesión a HUVECs: la cepa de prueba meningocócica en este estudio fue un derivado Opa- y Opc- no
25 piliado, no encapsulado de la cepa NmA8013. Las células

meningocócicas (la colonia $2.10E5$ que forma unidades (CFU) del derivado NmA8013) se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un medio compuesto de 400 μl de RPMI, 50 μl de suero de bovino fetal y 50 μl de suero que va ser probado para las propiedades de bloqueo de adhesión. Esta mezcla después se colocó en una cavidad conteniendo monocapas confluentes de células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVECs) cuyo medio de cultivo has sido previamente removido. Las células de bacteria y de HUVEC fueron incubadas durante 4 horas a 37°C , bajo CO_2 al 5%. Las monocapas de células después se lavaron tres veces con suero RMPI fresco y subsecuentemente se eliminaron de la placa. CFU asociado con las células HUVEC después fueron determinadas como dilución serial y se colocaron en placas del lisato de célula sobre placas GC. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C para permitir la recuperación y crecimiento de meningococo asociado con célula.

Actividades de adhesión-bloqueo de suero de ratón y conejo cultivado contra los antígenos HFAB2/3°, Hap y Hsf recombinantes: los anticuerpos anti-FHA 2/3, anti-Hsf de longitud completa (descrito en WO 99/58683) y anti-Hap de longitud completa (WO 99/55873), así como anti-suero dirigido contra los dominios pasajeros Hsf y Hap correspondientes, interfieren con la adhesión meningocócica a células HUVEC endoteliales. La Figura 8 ilustra que los anticuerpos específicos inducidos a través de FHA 2/3 formulados en AlPO_4 , fueron capaces de inhibir la adhesión a

Neisseria meningitidis B a células HUVEC comparado con el auxiliar solo. Cuando se compararon con el auxiliar SBAS2 solo (sin antígeno, grupo 4) el anti-FHA 2/3 abs (formulación SBAS2) aún es efectivo, pero menos potente que AlPO_4 . El auxiliar SBAS2 solo (sin antígeno) no induce anticuerpos capaces de interferir con la adhesión. Comparado con el grupo 4, los anticuerpos anti-Hap (grupo 1) pueden tener un ligero efecto inhibidor. En el grupo 5, cuando se prueba una mezcla de anticuerpos anti-FHA 2/3, anti-Hsf, y anti-Hap, la inhibición de la adhesión es más fuerte que con anti-FHA 2/3 solo, sugiriendo un efecto sinérgico dado a través de los anticuerpos anti-Hap y anti-Hsf. En un segundo experimento de inhibición (Figura 2), un antisuero de conejo específico dirigido contra anti OMVs que sobre-expresa Hsf (como una proteína candidato) fue capaz de inhibir parcialmente la fijación de Neisseria meningitidis B a las células endoteliales comparado con el control negativo (grupo 3 contra 4). Este antisuero de conejo ha demostrado que contiene una concentración de anticuerpo anti-Hsf específico alto. Los anticuerpos contra rec Hsf (Hsf pasajero y Hsf de longitud completa) también son capaces de inhibir la adhesión de la bacteria en las células HUVEC. Esto es cierto tanto con suero de ratones (grupos 5-6) así como con suero de conejo (en una extensión láser) (grupos 7-8). En este segundo experimento, los anticuerpos anti-rec FHA 2/3 específicos (grupo 1) ya probados en el primer experimento confirman su efecto inhibidor muy alto. Estos resultados indican que estos antígenos específicos (Hap, FHA2/3, y Hsf), aislados o en combinación, son

antígenos de vacuna interesantes.

EJEMPLO 12

Efecto Protector de OMVs recombinantes en el modelo de ataque de ratón

Han sido evaluados varios OMVs recombinantes en ratones Balb/C en su efecto protector después de un ataque letal. Este modelo de inmunización activo involucra la inyección intraperitoneal de meningococos de varias cepas (suspendidas en medio TSB reducido en hierro) en ratones Balb/C y OF1 adultos (de 6 a 8 semanas de edad), después de series de inmunizaciones a través de la ruta subcutánea. La dextrana de hierro, utilizada como una fuente de hierro externa parece ser necesaria para mantener la bacteriemia e inducir la mortalidad en el animal infectado. Aunque este modelo IP en ratones ha mostrado ser efectivo para evaluar la virulencia, la protección inmune y el papel del hierro en la infección, no incorporan la fase de transporte faringeo, la cual precede la bacteriemia y la meningitis en humanos. Este modelo ha sido utilizado para clasificar nuestros varios candidatos OMV que sobre expresan NspA, TbpA, o Hsf. En los siguientes experimentos, se inmunizaron ratones Balb/C (endogámicos) u OF 1 (no congénitos) tres veces en los días 0, 14, y 28 a través de la ruta subcutánea con 3 (PVOON049) a 5 µg (experimentos PV00N035 y PV00N043) de rec. OMV sobre- expresando Hsf, NspA o TbpA formulado en A1(OH)₃ (100 µg A1

(OH)₃/animal) (PV00N035 y PV00N043) o en A1 PO₄ (100 µg A1 PO₄/animal). Después, los animales se sangraron en los días 28 (día 14 después de II) y día 35 (día 7 después de III) para la evaluación Ab específica. En el día 35, 10 mg de dextrana de hierro se inyectó intraperitonealmente una hora antes del ataque. Los ataques se hicieron con las cepas H44/76 (B:15:P1. 7,16) o CU- 385 (B:4:P1. 19,15), con alrededor de 1.10 e7 de CFU/animal (ver el cuadro de resultados para la dosis de ataque exactas). La cepa heteróloga hecha con la cepa CU-385 es más estricta que cuando se utiliza la cepa homóloga. Las mortalidades se registraron a partir de los días 1 a 5. El cuadro 1 a continuación ilustra que cuando se compara con OMV, porA(-) y con OMV TbpA (+) en una extensión más corta, ya existe una mejor protección observada con OMV TbpA (+) y 3/5 para porA (-) y 9/10 y 3/5 para porA(+)), con OMV NspA (+) (4/10 y 4/5) y con OMV Hsf (+) (3/10,2/10 y 3/5). Esta es la observación global que se puede hacer es estos tres experimentos. Estos datos soportan que los antígenos TbpA, Hsf y HspA, expresados en la superficie de la ampolla, sean de interés para una vacuna *menB* futura.

20

CUADRO 1

Actividad protectora en el modelo de ratón de vesículas de membrana exterior

El cuadro resume los resultados obtenidos durante tres experimentos (PV00N035, PV00N043 y PV00N049)

25

OMVs (Ampollas)

5	OMVs rec (antecedentes H44/76 = porA P1.17, 16)	Tasa de supervivencia (protección del ratón activa en el día)			Abs Inmuno específicos a través de Elisa Media – PV00N049 solo
		PV00N035 en ratones OF1	PB00N043 en ratones Balb/C	PV00N049 en ratones OF1	
		Cepa de ataque (+			
		H44/76 (B:15:P1.7, 1.27	H44/76 (B:15:P1.7, 1.0	H44/76 (B:15:P1.7, 1.1	
10	OMV porA(-)	1/10	0/10	1/5	/
	OMV porA(+)	2/10	9/10	4/5	/
	OMV TbpA porA(+)	NT	9/10	3/5	<
	OMV TbpA porA(-)	NT	1/10	3/5	<
	OMV NspA porA(+)	1/10	4/10	4/5	155 – (<
	OMV Hsf porA(-)	3/10	2/10	3/5	7802-(5496)
	OMV Hsf porA(+)	NT	9/9	NT	/
	Sin antígeno	0/10	0/10	1/5	/

15 NT: No probado

EJEMPLO 13

Efecto protector de antígenos de subunidad recombinantes en el modelo de ataque de ratón

20

Han sido evaluadas varias proteínas purificadas recombinantes en ratones Balb/C por su efecto protector después del ataque letal. Este modelo de inmunización activo involucra la inyección intraperitoneal de meningococos de varias cepas (suspendidas en medio TSB reducido en hierro) en ratones Balb/C y OF1 adultos (de 6 a 8 semanas de edad), después de series de inmunizaciones a través

de la ruta subcutánea.

La dextrana de hierro, utilizada como una fuente de hierro externa parece ser necesaria para mantener la bacteriemia e inducir la mortalidad en el animal infectado. Aunque este modelo IP en ratones ha mostrado ser efectivo para evaluar la virulencia, la protección inmune y el papel del hierro en la infección, no incorporan la fase de transporte faringeo, la cual precede la bacteriemia y la meningitis en humanos. Este modelo ha sido utilizado para clasificar nuestros varios candidatos de vacuna de sub-unidad *menú* de tipo moléculas recombinantes FrpC, TbpA, FHA2/3 y Hap OMV que sobre expresan NspA, TbpA, o Hsf.

En este experimento, se inmunizaron ratones OF 1 (no congénitos) tres veces en los días 0, 14, y 28 a través de la ruta subcutánea con 5 µg (PV00N050) de estas proteínas formuladas en A1 PO₄ (100 µg) en presencia de 10 µg de MPL (por animal).

Después, los animales se sangraron en los días 28 (día 14 después de II) y día 35 (día 7 después de III) para la evaluación Ab específica, mientras se atacaron en el día 35. En el día del ataque se inyectaron 10 mg de dextrana de hierro intraperitonealmente una hora antes del ataque. Los ataques se hicieron con las cepas CU-385 (B:4:P1.19,15), las cuales son heterólogas en este caso, ciertamente, la secuencia de los antígenos que vienen de H44/76 (B:15:p1.7,16), excepto para TbpA para el cual la secuencia viene de la cepa B16B6 (B:2a:P1.2).

Los resultados ilustrados en el cuadro 2 indican que FrpC,

TbpA, FHAB2/3°, Hap indujeron una protección significativa en este modelo: de 2 a 4 de 5 ratones sobrevivieron después del ataque, comparado con solamente 1/5 con el auxiliar solo. En todos los grupos menos uno, la concentración del anticuerpo específico fue alto (la concentración de anti-TbpA específica fue moderada). Todos estos datos soportan que FrpC, FrpA, el dominio conservado FrpA/C, TbPA, FHAB2/3°, Hap presentados como antígenos de sub-unidad, aislados o en combinación, son de interés para el desarrollo de una vacuna *menB*.

10

15

20

25

CUADRO 2

Actividad Protectora en el modelo de ratón de vesículas de membrana exterior recombinantes

5 El cuadro resume los resultados obtenidos durante un experimento (PV00N050).

Antígenos de Sub-unidad

10

15

20

Rec de antígenos de sub-unidad (de la secuencia Ag H44/76)	Tasa de supervivencia	Abs inmunoespecíficos a través de ELISA Media – (GMT)
	Modelo de protección de ratón activo	
	PV00N050 (en ratones OF1)	
	Cepa atacada (+dosis)	
	CU-385 (B:4:P1.19,15) 1.4 10e7	
FrpC Ca2++ tratado	3/5	31477 – (27068)
FHAB 2/3 replegado	2/5	98200 – (73220)
FHAB 2/3 no replegado	3/5	55939 – (35347)
Hap N-ter	4/5	9960 – (12811)
recTbpA en SBAS4	3/5	875 – (520)
SBAS4	1/5	/

EJEMPLO 14

Método para mostrar el efecto sinérgico de combinaciones de antígenos de vacuna

25 Diferentes OMVs recombinantes disponibles (OMVs porA

(+)rmp-LbpB, OMVs porA (-) TbpA (+) Hsf (+), OMVs porA (-) TbpA (+), OMVs porA (-) NspA (+), OMVs porA (-) Hsf (+), OMVs porA (-) TbpA (+) NspA (+)) pueden ser probados solos o en combinación para determinar estadísticamente las mejores combinaciones, en
 5 términos de detección de un efecto sinérgico con combinaciones de antígenos de subunidad, así como la combinación de antígenos de subunidad + OMVs recombinantes. 32 grupos de 5 OF1 ratones/grupo pueden ser inyectados y probados para actividad del suero bacterial y actividad opsonica, protección activa y pasiva en el modelo de
 10 ratón (si necesitar estar utilizando cantidades subóptimas de antígenos individuales). Una indicación de las combinaciones de antígeno sinérgicas es si el nivel protector conferido después de la inmunización combinada es mayor que la suma de los antígenos individuales.

15

EJEMPLO 15

Análisis del contenido de Hsf y TbpA de Vesículas de Membrana Exterior

20 SDS-PAGE teñido con Coomassie azul

Se diluyeron 15 µg de proteína en las preparaciones de vesícula de membrana exterior con regulación ascendente de Hsf o TbpA o ambas, Hsf y TbpA, en un regulador de pH de muestra conteniendo β-mercaptoetanol y se calentó a 95°C durante 10
 25 minutos. Las muestras después se corrieron en gel de poliacrilamida

SDS-PAGE (Novez 4-20% de Tris-glicina, 1.5 mm 2Dcavidad de SDS-PAGE), se tiñeron en Commassie azul durante una hora y de destiñeron en varios lavados de desmanchador. Los resultados se muestran en la Figura 9, la cual muestra que el nivel de Hsf y TbpA es considerablemente mayor en las preparaciones de vesícula de membrana exterior, derivadas de *N. meningitidis* en donde su nivel de expresión ha sido mejorado.

EJEMPLO 16

10 Inmunogeneicidad de OMVs con regulación ascendente de Hsf y/o TbpA

Se inmunizaron grupos de 20 ratones tres veces con OMV a través de la ruta intramuscular en los días 0, 21 y 28. Cada inoculación fue hecha de 5 µg (contenido de proteína) de OMVs formulados en AIPO4 con MPL. Los OMVs se derivaron de la cepa H44/76 de *N. meningitidis*, diseñada para que los polisacáridos capsulares y PorA fueran regulados de manera descendente. Se hizo una comparación de OMVs en los cuales Hsf, TbpA, ambos Hsf y TbpA o ninguno fue regulado de manera ascendente. En el día 41, las muestras sanguíneas se tomaron para análisis a través de ELISA o a través del ensayo bactericida del suero.

ELISA para detectar anticuerpos contra Hsf

25 Se recubrieron microplacas de 96 cavidades (Nunc, Maxisorb)

durante la noche a 4°C con 100 µl de 1 µg/ml de antígeno específico en PBS. Después de lavar con NaCl 150 mM de Tween 20 0.05%, las placas se saturaron con 100 µl de PBS-BSSA 1% bajo agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entre cada paso
5 (realizado bajo agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y con PBS-BSA 0.2% como regulador de pH diluyente), los reactivos en exceso se removieron a través de lavado con NaCl-Tween 20. Se agregaron cien micro-litros de muestras de suero diluido por micro-cavidad. Los anticuerpos enlazados se reconocieron a través de Ig
10 de anti-ratón biotecnizados (Prosan) (1/2000). El complejo de antígeno-anticuerpo se reveló a través de incubación con conjugado de peroxidasa biotecnizada de estreptavidina (Amersham) (1/4000). Se utilizó OrtoFenilenoDiamina/H₂O₂ (4 mg/10 ml de regulador de pH de citrato 0.1M pH 4.5 + 5 µl de H₂O₂) para revelar el ensayo. Las
15 placas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad antes de detener la reacción a través de la adición de 50 µl de 1N de HCl. La absorbancia se leyó a 490 nm.

20

	Punto medio de concentración (en el suero sondeado)
g1, ampollas TbpA-Hsf, IM	15471
g2, ampollas TbpA, IM	15.41
g3, ampollas HSF, IM	14508
g4, ampollas CPS(-)PorA(-), IM	-
25 g5, MPL/AIPO4, IM	-

Los resultados mostrados en el cuadro anterior, muestran que las concentraciones de anticuerpo altas y equivalentes contra Hsf fueron creadas a través de la inmunización con OMVs con regulación ascendente de Hsf o ambos Hsf y TbpA. Virtualmente ningún anticuerpo contra Hsf pudo ser detectado en el suero creado después de la inoculación con el auxiliar solo u OMV en el cual ningún Hsf ni ningún TbpA habían sido regulado en forma ascendente u OMV en el cual solamente TbpA había sido regulado en forma ascendente.

10

EJEMPLO 17

Actividad Bactericida del Suero de antisuero cultivado contra OMVs con regulación ascendente de Hsf y/o TbpA

La actividad bactericida de suero de los ratones inoculados con OMVs con regulación ascendente de Hsf, TbpA, tanto Hsf y TbpA o sin regulación ascendente se compararon en ensayos utilizando cualquiera de las cepas homólogas H44/76 o la cepa heteróloga Cu385. El ensayo bactericida del suero había mostrado que muestra una buena correlación con la protección y por consiguiente una buena indicación de que tan efectiva sería una composición candidato en la provocación de una respuesta inmuno protectora.

Las cepas de tipo silvestre del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (cepa H44/76 =B: 15P1.7, 16 L3, 7, 9 y la cepa CU385 =B : 4P1.19, 15 L3,7,9) se cultivaron durante la noche en MH + 1% de Polivitex + 1% de suero de caballo en platos de Petri a 37°C + 5%

de CO₂. Se sub-cultivaron durante 3 horas en un medio TSB líquido suplementado con 50 µg de Desferal (quelatador de hierro) a 37° durante la noche para lograr una densidad óptica de aproximadamente 0.5 a 470 nm.

- 5 El suero agrupado o solo se inactivó durante 40 minutos a 56°C. Las muestras de suero se diluyeron 1/100 en HBSS-BSA 0.3% y después se diluyeron serialmente dos veces (8 diluciones) en un volumen de 50 µl en microplacas de fondo redondo.

- La bacteria, al OD apropiado, se diluyó en HBSS-BSA 0.3%
10 para producir 1.3×10^4 CFU por ml, se agregaron 37.5 µl de esta solución a las diluciones de suero y las microplacas se incubaron durante 15 minutos a 37°C bajo agitación. Después, se agregaron 12.5 µl de complemento de conejo a cada cavidad. Después de 1 hora de incubación a 37°C y bajo agitación, las microplacas se
15 colocaron sobre hielo para detener la aniquilación.

- Al utilizar el método de inclinación, 20 µl de cada cavidad se colocaron en placas en MH + 1% de Polivitex + 1% de suero de caballo en platos de Petri y se incubaron durante la noche a 37°C + CO₂. Los CFUs se contaron y se calculó el porcentaje de
20 aniquilación. La concentración bactericida del suero es la última dilución produciendo $\geq 50\%$ de aniquilación.

	OMV	H44/76		CU385	
		GMT	% de respondedores	GMT	% de respondedores
5	CPS (-) PorA (-)	93	30%	58	5%
	CPS (-) PorA (-) Hsf	158	40%	108	20%
	CPS (-) PorA (-) TbpA	327	60%	147	30%
	CPS (-) PorA (-) Hsf - TbpA	3355	100%	1174	80%

Se obtuvieron similares resultados a aquellos mostrados en el cuadro anterior en otros dos experimentos similares.

Un incremento dramático en las concentraciones bactericidas (GMT) contra la cepa homóloga y la cepa heteróloga se vio después de la vacunación con OMV en el cual ambas Hsf y TbpA se regularon de manera ascendente. A través de la comparación, los GMTs bactericidas medidos en ratones vacunados con OVMs de Hsf o TbpA regulados de manera ascendente fueron similares a aquellos obtenidos con los ratones vacunados con OMVs de control.

El beneficio de doble regulación ascendente también fue claramente observado en el porcentaje de ratones que producen un nivel significativo de anticuerpos bactericidas (concentraciones mayores de 1/100), particularmente en experimentos utilizando la cepa heteróloga.

EJEMPLO 18

Efecto de mezclar suero anti-Hsf y anti-TbpA en actividad bactericida

Se inmunizaron grupos de 20 ratones con OMV a través de la

ruta intra-muscular en los días 0, 21 y 28. Cada inoculación fue hecha de 5 µg (contenido de proteína) de OMVs formulados en AlPO4 con MPL. Los OMVs se derivaron de la cepa H44/76 de *N. meningitidis*, diseñada para que los polisacáridos capsulares y PorA fueran regulados de manera descendente. Un grupo de ratones se inmunizó con OMVs de control en los cuales no hubo regulación ascendente de proteínas. En un segundo grupo, la expresión de Hsf se reguló de manera ascendente, en un tercer grupo la expresión de TbpA se reguló de forma ascendente y en un cuarto grupo, la expresión de ambos, Hsf y Hipa se reguló de manera ascendente.

El suero se agrupó, ya sea utilizando suero de ratones en el mismo grupo o mezclando suero aislado del grupo en donde el Hsf solo o TbpA solo ha sido regulado de manera ascendente. La actividad bactericida del suero se midió para cada suero agrupado y los resultados se muestran en el siguiente cuadro.

SBA hecho en el suero reunido de ratones inmunizados con	Concentración de SBA
Ampollas TbpA-Hsf	774
Ampollas TbpA	200
Ampollas Hsf	50
Ampollas CPS(-) PorA(-)	50
Mix anti-TbpA + suero anti-Hsf	1162

Los resultados en el cuadro anterior muestra que la mezcla de antisuero anti-Hsf y anti-Tbpa da como resultado un actividad bactericida mucho más alta que la lograda a través de cualquier

suero individualmente. El efecto sinérgico parece ser logrado a través de la presencia de anticuerpos contra ambos, Hsf y TbpA.

EJEMPLO 19

5 Proteínas Hsf truncadas pueden combinarse sinérgicamente con TbpA

Se produjeron series de construcciones Hsf truncadas utilizando procedimientos de biología molecular estándares. Estos
10 incluyen una construcción que codifica los aminoácidos 1 a 54 que contienen la secuencia de señal de Hsf y los aminoácidos 134 y 592 de Hsf (Tr1Hsf). Un segundo Hsf truncado conteniendo los aminoácidos 1-53 de la secuencia de señal de Hsf seguido por los aminoácidos 238-592 de Hsf (Tr2Hsf). Estas dos construcciones Hsf
15 truncadas y Hsf de longitud completa se introdujeron en Mc58 siaD-, Opc-, PorA- de la cepa B de *N. Meningitidis* por lo que su expresión podría ser regulada de forma ascendente y se produjeron las vesículas de membrana exterior utilizando los métodos descritos anteriormente.

20 Las preparaciones de vesícula de membrana exterior se adsorbieron en Al(OH)₃ y se inyectaron dentro de los ratones en los días 0, 21, y 20. En el día 42, los ratones se sangraron y se preparó el suero. El suero se mezcló con suero de ratones vacunados con OMVs de TbpA regulados de forma ascendente y los ensayos
25 bactericidas de suero se llevaron a cabo como se describió

anteriormente.

Resultados

5		Concentraciones Bactericida del Suero	
		H44/76	CU385
10	Grupo		
	Mc58 PorA + siaD+	25600	25600
	Mc58 PorA – siaD- Hsf	1530	800
	Mc58 PorA – siaD- Tr1Hsf	1015	1360
	Mc58 PorA – siaD- Tr2Hsf	50	50
	Control negativo	50	50
	TbpA + MC58 PorA+ siaD+	25600	24182
	TbpA + MC58 PorA- siaD- Hsf	2595	1438
	TbpA + MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	4383	2891
	TbpA + MC58 PorA- siaD- Tr2Hsf	1568	742
	TbpA + control negativo	778	532

15 Los resultados mostrados en el cuadro anterior revelan que la
primera truncación (Tr1Hsf) provoca una respuesta inmune que es
capaz de combinarse con antisuero contra TbpA para producir una
actividad bactericida de suero más grande que cuando se utiliza Hsf
de longitud completa. Sin embargo, la extensión de la truncación es
20 importante y la truncación producida en Tr2 tiene un efecto de
deterioro comparado con el Hsf de longitud completa. La actividad
bactericida mejorada de Tr1Hsf ha sido vista contra ambas cepas
utilizadas.

EJEMPLO 20**Actividad bactericida del suero de anticuerpos contra TbpA, Hsf
y una tercera proteína meningocócica**

5 La cepa H44/76 de *N. meningitidis* en la cual PorA y los
polisacáridos se regulador en forma descendente como se describió
anteriormente, se utilizaron como la cepa base para regular de forma
ascendente TbpA y Hsf, LbpB, D15, PilQ y NspA utilizando el
procedimiento descrito anteriormente. Las vesículas de membrana
10 exterior se prepararon de cada cepa como se describió
anteriormente. FHAb, FrpC, FrpA/C y Hap se prepararon utilizando
técnicas descritas aquí anteriormente y conocidas en la técnica
(como se describe en PCT/EP99/02766, W092/01460 y W098/02547).

Las preparación de vesícula de membrana exterior y proteínas
15 recombinantes se adsorbieron en Al(OH)₃ y se inyectaron en los
ratones en los días 0, 21, y 28. En el día 42, los ratones se
sangraron y se prepararon. El suero contra OMVs regulados de forma
ascendente de TbpA y Hsf se mezcló con suero de ratones
vacunados con OMVs conteniendo los OMVs de LbpB, D15, PilQ o
20 NspA regulados en forma ascendente o FHAb, FrpC, FrpA/C, o Hap y
los ensayos bactericidas de suero se llevaron a cabo como se
describió anteriormente

Resultados

25 Los resultados se muestran en el siguiente cuadro. En los

ensayos que utilizan la cepa H44/76 homóloga, la adición de anticuerpos contra un tercer antígeno meningocócico, con la excepción de FrpC, no produjeron una concentración bactericida de suero más alta que la producida utilizando anticuerpos contra TpbA y Hsf solos.

Sin embargo, la adición de anticuerpos contra un tercer antígeno se ventajosa en ensayos bactericidas de suero utilizando la cepa heteróloga. Los anticuerpos contra D15 (OMP85), Hap, FrpA/C y LbpB fueron particularmente efectivos en el incremento de concentración bactericida de suero contra la cepa CU385.

Concentración Bactericida del suero		
Mezcla de antisuero	H44/76	CU385
anti-TbpA- Hsf y suero autoinmune	5378	2141
anti-TbpA- Hsf y suero anti-FHA	5260	2563
anti-TbpA- Hsf y suero anti-Hap	4577	5150
anti-TbpA- Hsf y suero anti-FrpA/C	5034	4358
anti-TbpA- Hsf y suero anti-LbpB	5400	4834
anti-TbpA- Hsf y suero anti-D15	4823	4657
anti-TbpA- Hsf y suero anti-PilQ	4708	2242
anti-TbpA- Hsf y suero anti-NspA	4738	2518
anti-TbpA- Hsf y suero anti-FrpC	6082	2300

EJEMPLO 21**Efecto de FrB KO en vesículas de membrana exterior en su
habilidad para provocar una respuesta inmune bactericida en
cepas homólogas y heterólogas**

5

Se utilizaron dos cepas de H44/76 de *N. meningitidis* para preparar preparaciones de vesícula de membrana exterior como se describe en WO 01/09350, utilizando 0.1% de extracción de DOC por lo que el contenido de LOS fue de alrededor de 20%. La cepa B1733
10 es *siaD*(-), *PorA*(-), tiene regulación ascendente de *Tr1* *Hsf* (Ejemplo 19) e *IgtB* está aniquilado. La cepa B1820 B1733 es *siaD*(-), *PorA*(-), tiene regulación ascendente de *Tr1*, *Hsf*, *IgtB* está aniquilada y *FrpB* también está aniquilada. Ambas cepas se cultivaron en medio suplementado con 60 μ M de Desferal por lo que las proteínas
15 reguladas en hierro tales como *LbpA/B* y *TbpA/B* están reguladas en forma ascendente.

Las preparaciones de ampollas fueron adsorbidas en $Al(OH)_3$ y se inyectaron 5 μ g intramuscularmente en grupos de 30 ratones en el día 0 y en el día 2. Las muestras sanguíneas se tomaron en el día
20 28.

Los ensayos bactericidas de suero se llevaron a cabo en las tres cepas L3 (la cepa del tipo silvestre homóloga H44/76 y dos cepas L3 heterólogas; NZ124 y M972505687), como se describe en el Ejemplo 17.

25

Resultados

Ampollas utilizadas para la inoculación	H44/76		M97250687		NZ124	
	GMT	SC	GMT	SC	GMT	SC
B1733	1518	30/30	151	11/30	70	4/29
B1820	781	19/30	1316	24/30	276	19/30

5

GMT indica la concentración de la media geométrica del suero en SBA.

SC indica el número de ratones convertidos a cero (concentración SBA >1/100).

10

Los resultados claramente muestran que las ampollas FrpB KO (B1820) inducen una mejor respuesta cruzada-bactericida heteróloga que las ampollas FrpB(+) (B1733). Las concentraciones de SBA fueron mayores y una proporción más alta de ratones convertidos a

15 cero en las cepas M97250687 y NZ124. Los resultados en la cepa homóloga no fueron completamente buenos cuando se eliminó FrpB. Estos datos sugieren que FrpB conduce la respuesta inmune, pero ya que su proteína de membrana exterior es altamente variable, los anticuerpos contra esta proteína solamente son capaces de inducir la

20 aniquilación de la cepa homóloga.

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende por lo menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionada del grupo que
5 consiste de Hsf y Hap, y al menos un antígeno diferente seleccionado de las siguientes categorías:

a) por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, Hsf y Hap;

b) por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del
10 grupo que consiste de FrpC y FrpA/C;

c) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28 y NMB0964; o

d) por lo menos una proteína asociada con la membrana
15 Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, y GNA1870;

y en donde los antígenos, cuando están presentes en una vesícula de membrana exterior, han sido regulados en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.

20

2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, la cual es una composición de subunidad.

3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación
25 2, en donde al menos un antígeno de autotransportadora Neisserial

comprende el dominio pasajero de Hsf y el al menos un antígeno diferente es seleccionado de la siguiente lista: FhaB, NspA, el dominio pasajero de Hap, el dominio de superficie expuesta de OMP85, FrpC, LbpB, y Lipo28.

5

4. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una preparación de vesícula de membrana exterior, en donde los antígenos han sido regulados en forma ascendente (preferiblemente recombinantemente) en la vesícula de
10 membrana exterior.

5. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde al menos un antígeno de autotransportador Neisserial comprende Hsf y el al menos un antígeno diferente es seleccionado
15 de la siguiente lista: NspA, Hap, OMP85, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpB, PilQ, y GNA1870;

en donde el Hsf y el al menos un antígeno diferente son regulados en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.

20 6. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una composición de subunidad que tiene uno o más de los antígenos, y una preparación de vesícula de membrana exterior que tiene por lo menos un antígeno, el cual ha sido regulado en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.

25

7. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una composición de subunidad y una preparación de vesícula de membrana exterior, en donde la composición de subunidad comprende por lo menos uno de los antígenos seleccionados de la siguiente lista: FhaB, NspA, el dominio pasajero de Hsf, el dominio pasajero de Hap, el dominio de superficie expuesta de OMP85, FrpC, LbpB, Lipo28; y en donde la preparación de la vesícula de membrana exterior que tiene por lo menos un antígeno el cual ha sido regulado en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior ,comprende al menos un antígeno regulado en forma ascendente seleccionado de la siguiente lista, el cual es diferente de al menos un antígeno en las composiciones de subunidad: NspA, Hsf, Hap, OMP85, TbpA (alto), TbpA (bajo), , LbpB, PilQ, y GNA1870.

15

8. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-7, que comprende por lo menos dos preparaciones diferentes de vesícula de membrana exterior de la reivindicación 4 o 5.

20

9. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4-8, en donde además se selecciona NspA.

10. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4-9, en donde además se selecciona OMP85.

25

11. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4-10, en donde el al menos un antígeno de autotransportador Neisserial comprende Hsf y el al menos un
5 antígeno diferente comprende TbpA (alto).

12. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4-11, en donde el al menos un antígeno de autotransportador Neisserial comprende Hsf y el al menos un
10 antígeno diferente comprende TbpA (bajo).

13. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, que además comprende uno o más antígenos adicionales seleccionados de una lista que consiste de
15 Hap, LbpB y OMP85.

14. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-13 que comprende al menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionado del grupo que consiste de
20 Hsf yHap;
FhaB;

y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste FhaB, Hsf, LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (bajo), TbpA (alto), PilQ, GNA1870, NspA, , Lipo28, y NMB0964.

25

15. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-14, que comprende al menos un antígeno de autotransportadora Neisserial seleccionado del grupo que consiste de Hsf y Hap;

5 NspA;

y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: NspA LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (bajo), TbpA (alto), PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

10 16. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-15, que comprende al menos un antígeno de autotransportadora Neisserial seleccionado del grupo que consiste de Hsf y Hap;

TbpA (bajo);

15 y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (alto), TbpA (bajo), PilQ, , GNA1870y NMB0964.

17. La composición inmunogénica de acuerdo con las
20 reivindicaciones 1-16, que comprende al menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionado del grupo que consiste de Hsf y Hap;

TbpA (alto);

y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (alto), PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

- 5 18. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-17, que comprende al menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionado del grupo que consiste de Hsf y Hap; OMP85;
- y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
- 10 consiste de: FrpC, FrpA/C, PilQ, GNA1870, , Lipo28, y NMB0964.

19. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-18 , que comprende al menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionado del grupo que consiste de
- 15 Hsf y Hap; FrpC;
- y al menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilQ, GNA1870, y NMB0964.

20. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-19, que comprende al menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionado del grupo que consiste de Hsf y Hap;
- GNA1870;
- y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
- 25 consiste de: Lipo28, y NMB0964.

21. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-20, que comprende al menos un antígeno de autotransportador Neisserial seleccionado del grupo que consiste de Hsf y Hap; Lipo28; y por lo menos un antígeno adicional el cual es NMB0964.

22. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-21, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de lgtB o lgtE, preferiblemente el primero.

23. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-22, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior es incapaz de sintetizar el polisacárido capsular, y ha sido preferiblemente diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de SiaD, crtA, ctrB, ctrC, ctrD, synA (equivalente a synX y SiaA) o synB (equivalente de SiaB y synC (equivalente de siaC), preferiblemente SiaD.

24. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-23, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha

sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de OpC, OpA o PorA, preferiblemente PorA.

25. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-24, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de FrpB.

10 26. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 4-25, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de msbB y/o htrB, preferiblemente msbB.

15

27. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-26, que comprende un antígeno derivado de *Neisseria meningitidis*, preferiblemente el serogrupo B.

20 28. Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con las reivindicaciones 1-27, que comprenden un antígeno derivado de *Neisseria gonorrhoeae*.

29. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-28, en donde todos los antígenos neisserial se derivan de *N. meningitidis*, preferiblemente del serogrupo B.

5 30. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-29, que además comprende uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos.

31. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación
10 30, en donde los polisacáridos u oligosacáridos capsulares se derivan de bacterias seleccionadas del grupo que consiste de: serogrupo A, C, Y y W-135 de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, Grupo A de *Streptococci*, Grupo B de *Streptococci*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus*
15 *epidermidis*.

32. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 30 y 31, en donde el polisacárido u oligosacárido capsular está conjugado a una proteína.

20

33. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-32, que comprende un auxiliar.

34. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 33, que comprende sales de aluminio, preferiblemente fosfato de aluminio.

5 35. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 33 o 34, que comprende 3D-MPL.

36. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-35, y un portador
10 farmacéuticamente aceptable.

37. Una vacuna que comprende uno o más polinucleótido(s) que codifican al menos una proteína de autotransportador Neisserial y al menos una proteína diferente cuya expresión se conduce a través de
15 un promotor eucariótico, en donde al menos una proteína de autotransportadora Neisserial es seleccionado del grupo que consiste de Hsf y Hap, , y la al menos otra proteína diferente se selecciona de las siguientes categorías:

20 a) por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, Hsf y Hap;

b) por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FrpC y FrpA/C;

c) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, LbpB, Lipo28, y NMB0964; o

d) por lo menos una proteína asociada con la membrana
5 Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, y GNA1870.

38. Un método para hacer la composición inmunogénica de acuerdo
10 con las reivindicaciones 1-35, que comprende un paso de mezclar juntos por lo menos dos antígenos de Neisseria.

39. Un método para hacer la vacuna de acuerdo con la reivindicación 36, que comprende el paso de combinar la
15 composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-35 con un portador farmacéuticamente aceptable.

40. La composición inmunogénica de la reivindicación 14 que comprende Hsf;

20 FhaB;

y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (bajo), TbpA (alto), Hap, PilQ, GNA1870, NspA, Lipo28, y NMB0964.

41. La composición inmunogénica de la reivindicación 15 que comprende Hsf;

NspA;

y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
5 consiste de: LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA (bajo), TbpA (alto), PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

42. La composición inmunogénica de la reivindicación 17 que comprende Hsf;

10 TbpA (alto);

y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
consiste de: LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, PilQ, GNA1870, Lipo28, y
NMB0964.

15 43. La composición inmunogénica de la reivindicación 18 que comprende Hsf;

OMP85;

y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
consiste de: FrpC, FrpA/C, PilQ, GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

20

44. La composición inmunogénica de la reivindicación 19 que comprende Hsf;

FrpC;

y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
25 consiste de: PilQ, , GNA1870, Lipo28, y NMB0964.

45. La composición inmunogénica de la reivindicación 20 que comprende Hsf;

GNA 1870;

5 y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: Lipo28, y NMB0964.

46. La composición inmunogénica de la reivindicación 21 que comprende Hsf; Lipo28;

10 y por lo menos un antígeno adicional que es NMB0964.

47. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los antígenos se han regulado de manera ascendente en la vesícula de membrana exterior a través del crecimiento de una

15 cepa madre de Neisseria bajo condiciones limitadas de Hierro.

48. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde al menos un antígeno regulado de manera ascendente en la vesícula de membrana exterior ha sido regulado de manera

20 ascendente a través del crecimiento de una cepa madre de Neisseria bajo condiciones limitadas de Hierro.



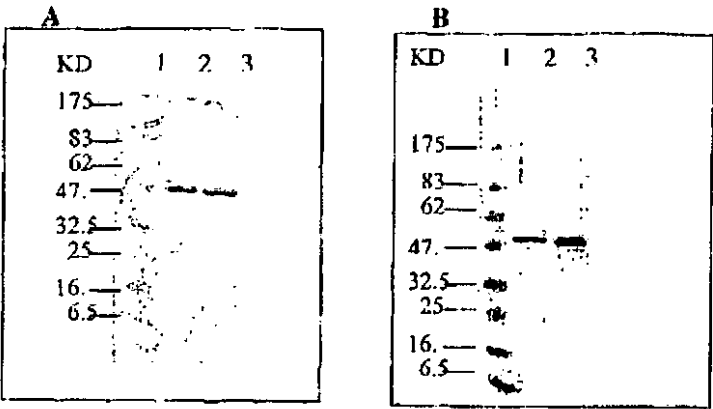


FIG. 2

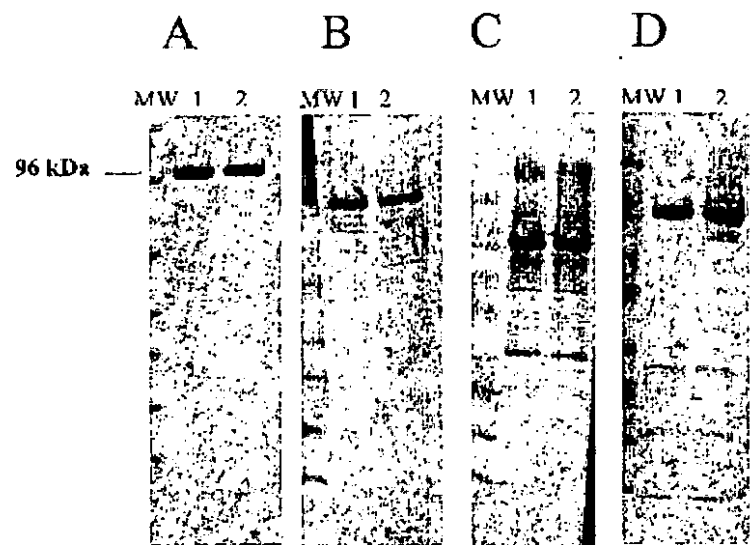


FIG. 3

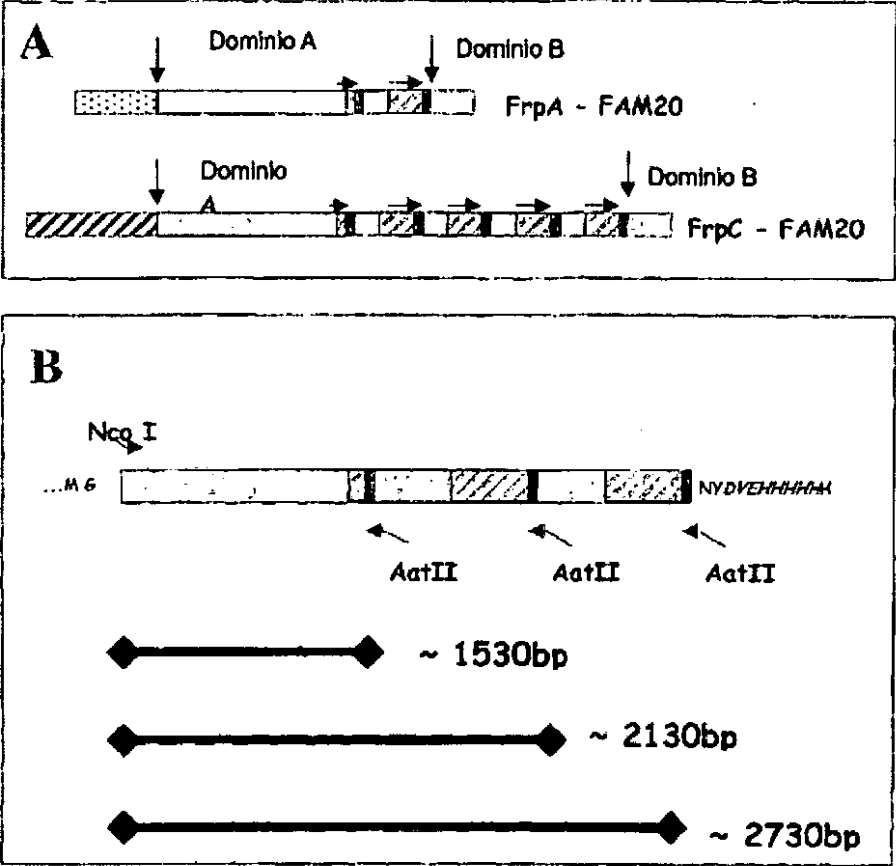


FIG. 4

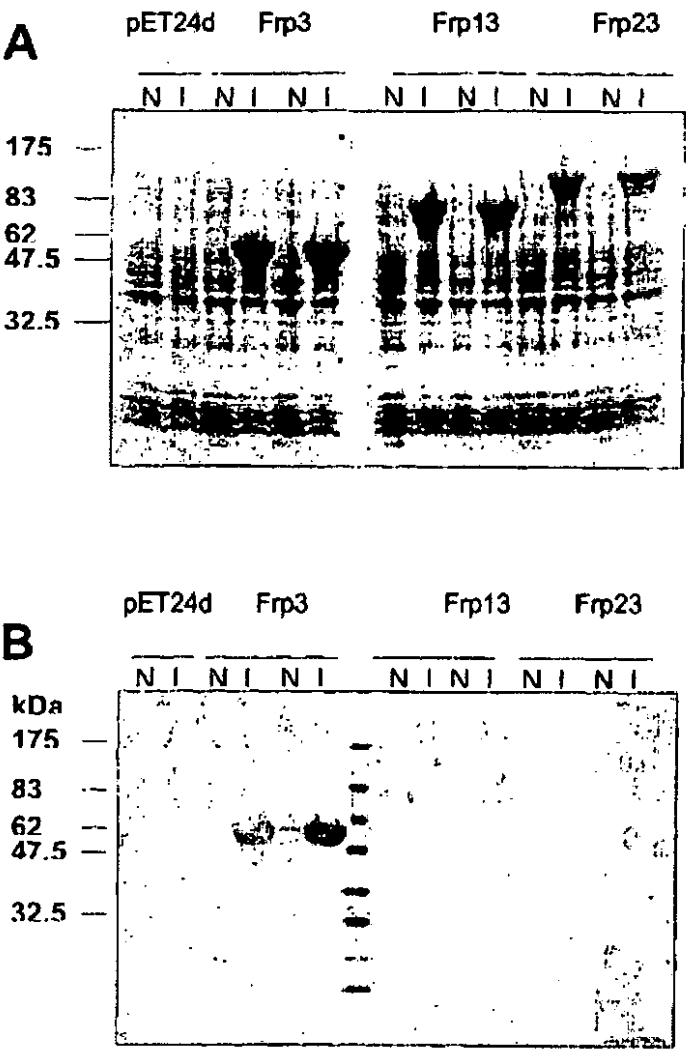


FIG. 5

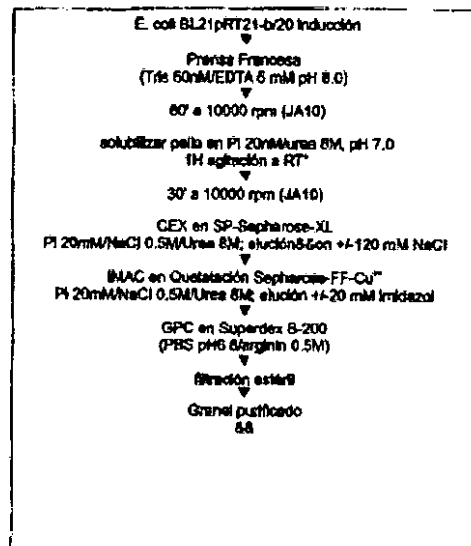
54 -

[illegible]

FIG. 6

FIG. 6 (continuación)

A



B

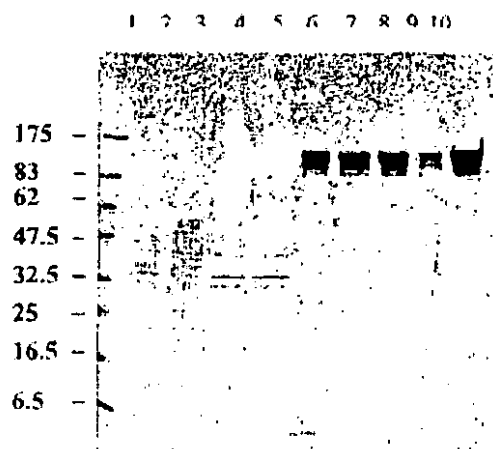


FIG. 7

9/11

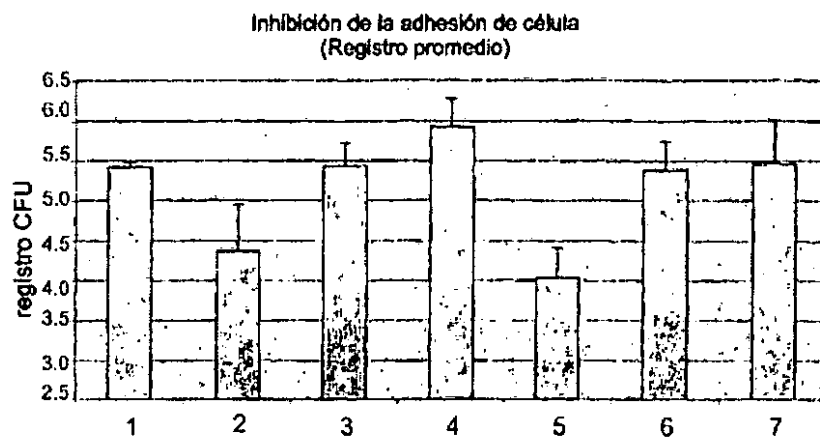


FIG. 8A

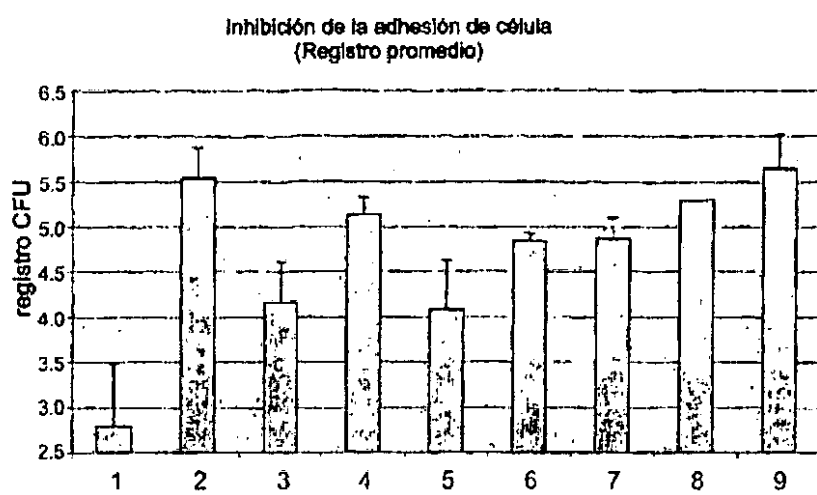


FIG. 8B

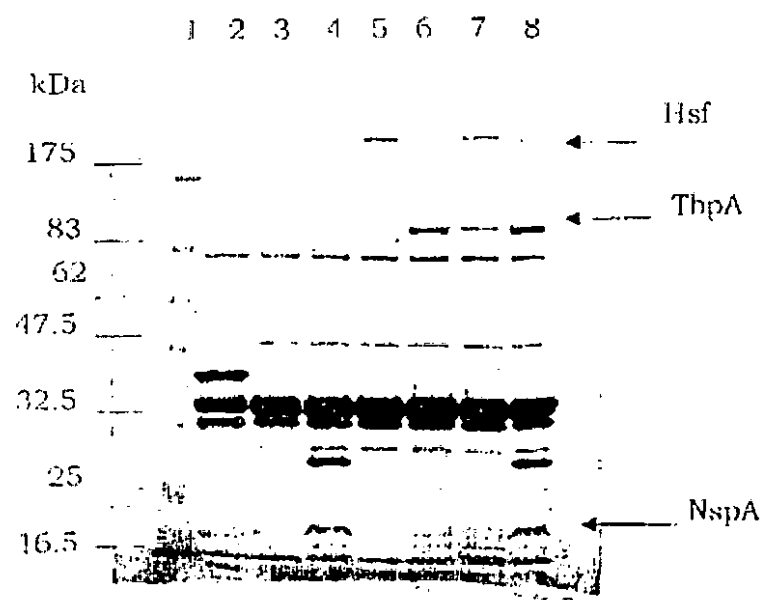


FIG. 9

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 091/05 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCÉS, EL CUAL PARA SU IDENTIFICACIÓN SE SELLA CON EL SELLO DEL TRADUCTOR. ESTA ES UNA TRADUCCIÓN OFICIAL EFECTUADA EL DIA 15 DE MARZO DE 2005 POR JEAN-JACQUES TURPIN, C.E.: 193849 DE BOGOTÁ, TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL SEGÚN RESOLUCIÓN No. 2680/91 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 1991, EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA.

Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de cesión conferido en inglés y español por (1) François-Xavier Jacques BERTHET, (2) Ralph BIEMANS, (3) Philippe DENOEL, (4) Christiane FERON, (5) Carine GORAJ, (6) Jan POOLMAN y (7) Vincent WEYNANTS, quienes declaran ceder a la sociedad GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A., una compañía organizada bajo las leyes de Bélgica, domiciliada en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica, todos sus derechos, título e intereses sobre su invención tal como describe: COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIA QUE COMPRENDE UNA COMBINACIÓN DE ANTIGENOS, en lo que concierne a la República de Colombia.

Firma ilegible de Ralph BIEMANS, Philippe DENOEL, Christiane FERON, Carine GORAJ, Jan POOLMAN y Vincent WEYNANTS, los días 10, 11 y 14 de febrero de 2005.

Legalización de la firma de Philippe DENOEL, Ralph BIEMANS, Christiane FERON, Carine GORAJ, Vincent WEYNANTS y Jan POOLMAN por el Señor Dominique Vinel, Notario en Rixensart, Genval. Dado en Rixensart, el 15 de febrero de 2005.

Sello: Dominique Vinel, Notario en Rixensart (Genval)

Traducción Oficial No. 091/05
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCÉS - ESPAÑOL
Res. Minjusticia No. 2680/91

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. - País: Bélgica

El presente documento público

2. - ha sido firmado por el Señor Vinel Dominique
3. - obrando en calidad de Notario
4. - con sello de Notario en Rixensart

CERTIFICADO

5. - En Bruselas
6. - El 16 de febrero de 2005
7. - Por el Servicio público federal de Relaciones Exteriores, Comercio exterior y Cooperación para el Desarrollo
8. - Bajo el número **9805050216185638**
9. - Sello: Servicio público federal de Relaciones Exteriores, Comercio exterior y Cooperación para el Desarrollo
10. - Firma ilegible de A. VERFAILLE.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para confrontación y a la cual me remito.

Traducción oficial No. 091/05.

Traductor: Jean-Jacques Turpin

Bogotá, D.C., 15 de marzo de 2005.

Traducción Oficial No. 091/05
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCOIS - ESPANOL
Res. Minjusticia No. 2680/91



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

338218

Jean T. León
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 MAR 16 A 10:57

MCB
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

ASSIGNMENT	CESION
I/We, Francois-Xavier Jacques BERTHET, Ralph BIEMANS, Philippe DENOEL, Christiane FERON, Carine GORAJ, Jan POOLMAN and Vincent WEYNANTS By means of this document assign to: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. a company organized under the laws of Belgium, domiciled in Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium (hereinafter referred to as the ASSIGNEE), all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful improvement entitled and as fully set forth and described in: NEISSERIAL VACCINE COMPOSITIONS COMPRISING A COMBINATION OF ANTIGENS So far as the Republic of Colombia is concerned. Place and date: <u>Francois-Xavier Jacques BERTHET</u> Place and date: <i>Rixensart, Belgen</i> <i>10 Feb 2005</i> <u>Philippe DENOEL</u>	Yo/Nosotros, Francois-Xavier Jacques BERTHET, Ralph BIEMANS, Philippe DENOEL, Christiane FERON, Carine GORAJ, Jan POOLMAN y Vincent WEYNANTS por medio de la presente cedo (cedemos) a GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. una compañía organizada baja las leyes de BELGICA, domiciliada en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica (de ahora en adelante el CESIONARIO), todos mis (nuestros) derechos, titulo e interes sobre mi (nuestra) invencion tal como describe en: COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA COMBINACION DE ANTIGENOS En lo que concierne a la Republica de Colombia Place and date: <i>Rixensart, Belgium</i> <i>10 February 2005</i> <u>Ralph BIEMANS</u> Place and date: <i>Rixensart, Belgium</i> <i>11 Feb 2005</i> <u>Christiane FERON</u>

Place and date:

Rixensart Belgium
Feb 14, 2005

Carine GORAJ

Place and date:

Rixensart, Belgium
14 February 2005

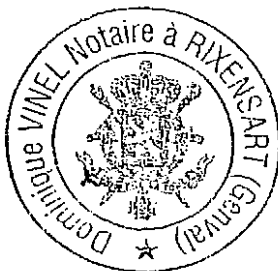
Vincent WEYNANTS

Place and date:

Rixensart Belgium
Feb 14, 2005

Jan POOLMAN

Vu par nous Notaire D. Vinel à
Genval pour légalisation de la signature
(des signatures) apposée(s) ci-dessous par
1) Mr. Philippe DENOEL;
2) Mr. Ralph BIEMANS;
3) Mme Christiane FERON;
4) Mme Carine GARAJ;
5) Mr. Vincent WEYNANTS;
6) Mr. Jan POOLMAN.
Rixensart, le 15 02/2005.



[Handwritten signature]

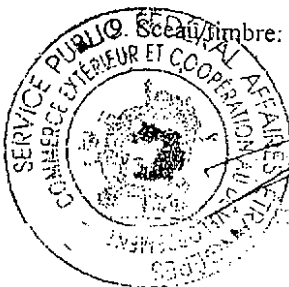
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays: Belgique
2. Le présent acte public a été signé par: Vinel, Dominique
3. agissant en qualité de: Notaire
4. est revêtu du sceau / timbre de: Notaire
Rixensart

Attesté

5. A Bruxelles
6. Le: 16/02/2005
7. par le Service public fédéral Affaires étrangères, Commerce extérieur et
Coopération au Développement
8. sous le n°: 9805050216185638



10. Signature:

ASSIGNMENT

CESIÓN

I, François-Xavier Jacques BERTHET

Yo, François-Xavier Jacques BERTHET

By means of this document assign to:

Por medio de la presente cedo a

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

A company organized under the laws of Belgium,

Una compañía organizada bajo las leyes de Bélgica

Domiciled in Rue de l'Institut 89, B- 1330 Rixensart,
Belgium

Domiciliada en Rue de l'Institut 89, B- 1330 Rixensart,
Bélgica

(hereinafter referred to as the ASSIGNEE), all my rights,
title and interest in and to my (our) invention for a new and
useful improvement entitled and as fully set forth and
described in:

(de ahora en adelante el CESIONARIO), todos mis
derechos títulos e interés sobre mi invención tal
como describe en:

NEISSERIAL VACCINE COMPOSITION
COMPRISING A COMBINATION OF
ANTIGENS

COMPOSICIONES VACUNAL CONTRA
NEISSERIA CONTENIENDO UNA
COMBINACIÓN DE ANTÍGENOS

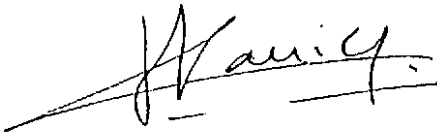
So far as the Republic of Colombia is concerned.

En lo que concierne a la República de Colombia

Place and date: Barcelona, Spain
Feb. 25th, 2005

Lugar y fecha: Barcelona, España
25 de febrero 2005

François-Xavier Jacques BERTHET



GENCIA DE LEGITIMACION:

D. VICTOR MATEU PORCAR Notario del Ilustre Colegio de Cataluña, con
residencia en la presente ciudad.

2/200

Doy fe de la legitimidad de la firma de D. FRANÇOIS XAVIER JACQUES
BERTHET con NIE X3749877-A por haber sido puesta en mi presencia y previamente
identificada por su Documento de Régimen Comunitario de Extranjeros.

En Granollers, a veinticuatro de febrero de dos mil cinco.

Núm. 931 del Libro Indicador

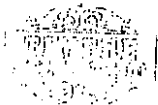
EL NOTARIO

SELLO DE
LEGITIMACIONES Y
LEGALIZACIONES



6A6102403

12/2004



APOSTILLE (ó legalización única)
(Convención de la Haya du 5 de octubre, 1961-Real Decreto/1978,
de 2 de octubre)

1. Pais ESPAÑA

El presente documento público

2. ha sido firmado por D. Víctor Mateu Porcar-----

3. Actuando en calidad de Notario, en legitimación de firma--
de D. François Xavier Jacques Berthet, puesta al pie de un
documento de cesión, libro indicador nº. 931, de fecha 24-
de febrero de 2005.-----

4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría.

C E R T I F I C A D O

5. En BARCELONA

6. El 02 de Marzo de 2005.

7. Por DON ANTONI BOSCH I CARRERA, Censor Segundo.

8. Con el N° : -11561-

9. Sello/timbre:

10. Firma:

0,15 SELLO DE
LEGITIMACIONES Y
LEGALIZACIONES



NIHIL PRIUS FIDE
A22488215

FE PÚBLICA
NOTARIAL



Antoni Bosch i Carrera
Censor Segundo

DILI.../...