

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

3 004732 00

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH
CENTER AT OAKLANDDirección: 5700 Martin Luther King Jr. Way,
Oakland, CA 94609Nacionalidad o Domicilio: Oakland, CA, US
Lugar de Constitución:

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CARRERA 9 No. 93-09

Teléfono: 610 74 80 Fax: 610 07 08

E-mail: acastell@impost.net.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número 39'779.854 TPA 70.819

④

INVENTOR (E8) (72)

Nombre: Dan Granoff y Gregory R. Moe

Dirección: 1085 Creston Road, Berkeley, CA 94708, US y 42 Steuben Bay, Alameda,
CA 94502, US

Nacionalidad o Domicilio ESTADOS UNIDOS

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No.

PCT/US01/23842

Fecha

27/07/2001

Publicación Internacional No.

WO 02/08643 A2

Fecha

7/2/02

⑥

Título (54)

VACUNAS PARA PROTECCION DE ESPECTRO AMPLIO CONTRA ENFERMEDADES
CAUSADAS POR NEISSERIA MENINGITIDIS

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/00

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

27/07/2000

60/221.495

⑨

Comprobante de pago No.

03-3.585

Fecha

Enero 17, 2003

10

Anexos

2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos, lista de secuencias).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos, lista de secuencias).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Requerimiento Capítulo II (se muestra la corrección del Nombre del Solicitante)

11 FIGURA CARACTERISTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA: Margarita Castellanos
C.C. No. 39.779.854 Uesquén - TPA 70.819 C.S.J.

24 ENE. 2003

VIT : 890176589-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 3,565
FECHA : ENEGO 17 DE 2003

Radicación : 43004732 00000000
Fecha (MM/AA): 2003-01-24 15:13:23
Trámite : 011 PCT-POTENT 370 FINE NDCI 411 PRESENTA
Dependencia: 2009 DEPENDENCIA DE NUEVAS CATEGORIAS
Folios: 291
cio
JA

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
DAKTEL AVILA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9933993	17/01/2003	400,000.00

CONCEPTO

CANT. CONTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL 1	400,000.00

50%: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Commutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: Info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

VACCINES FOR BROAD SPECTRUM PROTECTION AGAINST DISEASES CAUSED BY *NEISSERIA MENINGITIDIS*

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 This application claims the benefit of earlier-filed U.S. provisional application serial no. 60/221,495, filed July 27, 2000, which application is incorporated herein by reference in its entirety.

STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED RESEARCH

10 This invention was made with government support under grants no. AI46464 and AI45642 awarded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, and the National Institute of Health. The government may have certain rights in this invention.

FIELD OF THE INVENTION

15 This invention relates to broad-spectrum vaccines for the prevention of diseases caused by *Neisseria meningitidis*, especially serogroup B.

BACKGROUND OF THE INVENTION

20 *Neisseria meningitidis* is a Gram-negative bacteria which colonizes the human upper respiratory tract and is responsible for worldwide sporadic and cyclical epidemic outbreaks of, most notably, meningitis and sepsis. The attack and morbidity rates are highest in children under 2 years of age.

25 Like other Gram negative bacteria, *Neisseria meningitidis* typically possess a cytoplasmic membrane, a peptidoglycan layer, an outer membrane which together with the capsular polysaccharide constitute the bacterial wall, and pili which project into the outside environment. These surface structures mediate infection and interact with the host immune system. For example, a first step in infection with *Neisseria* is adherence to target cells, which is thought to be mediated by the pili and, possibly, other adhesins such as Opc. Protein, phospholipid and polysaccharide components of the outer membrane have been
30 reported to elicit an immune response.

Neisseria meningitidis spp. can be divided into serologic groups, types and subtypes on the basis of reactions with polyclonal (Frasch, C. E. and Chapman, 1973, *J. Infect. Dis.* 127: 149-154) or monoclonal antibodies (Hussein, A., MONOCLONAL ANTIBODIES AND *N. MENINGITIDIS*. Proefschrift. Utrecht, Nederland, 1988) that interact with different surface

Given the prevalence and economic importance of invasive *Neisseria meningitidis* infections, it is not surprising that many attempts have been made to develop treatments. Although these infections can be treated with antibiotics, about 10 to 20% of treated patients die, and many survivors are left with permanent neurologic sequelae, such as amputation,
 5 neurosensory hearing loss, and paralysis. Also, microorganisms can develop antibiotic resistance. Thus, prevention with vaccines is a preferable mode to contain the spread of infection.

Because the polysaccharide capsule is one of the outermost structures of pathogenic *Neisseria meningitidis*, it has been a primary focus of attempts to develop vaccines.

10 Different preparations of capsular polysaccharides have been used to control the outbreaks and epidemics of the serogroups A, C, Y and W-135, as mono-, di-, tri- or tetravalent vaccines (Gold et al., 1969-1970, *Bull. WHO* 45: 272-282; Gotschlich et al., 1969, *J. Exp. Med.* 129: 134-136; Hankins, 1982, *Proc. Soc. Biol. Med.* 169: 54-57; U.S. Pat. No. 6,080,589). However, capsular polysaccharide vaccines suffer from: poor or no-response to
 15 polysaccharide C in children under 2 years of age; thermolability of polysaccharide A; difficulties regarding the induction of immunologic tolerance after vaccination or re-vaccination with polysaccharide C (Granoff et al., 1998, *J. Infect. Dis.* 160: 5028-5030; MacDonald et al., 1998, *JAMA* 280:1685-1689; MacDonald et al., 2000, *JAMA* 283: 1826-1827). To circumvent these immunologic properties, polysaccharides from serogroups A
 20 and C have been covalently coupled to protein carriers to make "conjugate" vaccines. In contrast to plain polysaccharide vaccines, these conjugate vaccines are highly immunogenic in infants, upon re-injection elicit boostable increases in serum anticapsular antibody concentrations, and prime for the ability to generate memory antibody responses to a subsequent injection of plain polysaccharide (Campagne et al. 2000, *Pediat. Infect. Dis. J.*
 25 19: 144-150; MacLennan et al., 2000, *JAMA* 283: 2795-2801). Conjugate vaccines with similar properties have been highly effective in preventing invasive diseases caused by other encapsulated bacteria, such as *Haemophilus influenzae* type b or *Streptococcus pneumoniae*.

The capsular polysaccharide (PS) of serogroup B *Neisseria meningitidis* is a very poor immunogen in humans (Wyle et al., 1972, *J. Infect. Dis.* 126: 514-522; Zollinger, et al.,
 30 1979, *J. Clin. Invest.* 63: 836-834; Jennings et al., 1981, *J. Immunol.* 127: 104-108). Further attempts to improve the polysaccharide's immunogenicity through conjugation to protein have been unsuccessful (Jennings et al., 1981, *J. Immunol.* 127: 104-108). To enhance the immunogenicity, the meningococcal serogroup B capsule polysaccharide (MenB PS) has

been chemically modified (N-propionylated group was substituted for the N-acetyl group of B polysaccharide) and coupled covalently to a protein carrier (N-Pr-MenB PS-protein) conjugate. The vaccine induces in mice high titers of IgG antibodies which are bactericidal and protective (this concept is described and claimed in U.S. Patent No. 4,727,136, issued Feb. 23, 1988 to Jennings et al.). This vaccine also is immunogenic in sub-human primates, inducing serum antibodies that activate complement-mediated bacteriolysis (Fusco et al., 1997, *J. Infect. Dis.* 175: 364-372). In humans, such antibodies are known to confer protection against developing meningococcal disease (Goldschneider et al., 1969, *J. Exp. Med.* 129:1307). However, a subset of the antibodies induced by this vaccine have autoantibody activity to unmodified MenB PS (i.e. N-acetyl-MenB PS), Granoff et al., 1998, *J. Immunol.*, 160: 5028-5036, which raise serious safety concerns about the use of this vaccine in humans. Therefore, investigators have sought alternative approaches to develop a safe and effective vaccine for prevention of disease caused by serogroup B strains.

Other groups have focused on surface proteins as vaccines. For example, the principal protein component of the pilus, pilin, elicits an immune response; however, so many antigenic variants exist and continue to develop that vaccines against the pilus protein have not been highly effective. See, U.S. Patent No. 5,597,572. In other examples, vaccines have focused the highly conserved Neisserial surface protein A (NspA) (see, e.g., PCT Publication No. WO96/29412). Although the gene is highly conserved and expressed in virtually all strains, both polyclonal and monoclonal antibodies prepared against recombinant NspA are bactericidal and/or provide protection, against only about 50% of genetically diverse strains (Moe et al. (1999 *Infect. Immun.* 67: 5664; Moe et al. *Infect Immun.* 2001 69:3762). These observations suggest that recombinant NspA alone will not provide adequate protection against a broad spectrum of Neisserial strains.

Still other groups have used membrane preparations to induce immunity. In general, attempts to produce a meningococcal B vaccine based on outer membrane vesicles used repeated immunizations with material prepared from a single strain or repeated immunization with a vaccine containing vesicle antigens from multiple strains. When the vaccine contained vesicle antigens from more than strain, the resulting bactericidal antibody titers of infants or children given two or three doses were low (Cartwright K et al, 1999, *Vaccine*, 17:2612-2619; de Kleinjn ED et al, 2000, *Vaccine*, 18:1456-1466), In these studies, and in a study done in cynomolgus monkeys (Roupe van der Voort ER, 2000, *Vaccine*, 18:1334-1343) there also was evidence of immune interference between the

responses to the different antigen. When repeated immunization with vesicles from a single strain was used, higher antibody titers resulted but the spectrum of antibody reactivity was limited to only a few strains that tended to be serologically similar to each other (Tappero et al., 1999, *JAMA* 281:1520; and Roupe van der Voort ER, 2000, *Vaccine*, 18:1334-1343).

5 Our experiments in laboratory animal models, which are described below confirmed this latter observation. Antisera from control animals given two sequential immunizations of a outer membrane vesicle vaccine prepared at the National Institute of Public Health, Oslo, Norway, from a single *Neisseria meningitidis* serogroup B strain, H44/76 (B:15:P1.7,16; "Norwegian vaccine"), reacted by flow cytometry and were bactericidal against only
10 serogroup B strains that were of the same serosubtype (i.e. P1.7,16) or strains having an epitope similar to the P1.16 epitope (such as P1.10-4 strains).

Humans are the only known reservoir for *Neisseria meningitidis* spp. Accordingly, *Neisserial* species have evolved a wide variety of highly effective strategies to evade the human immune system. These include expression of a polysaccharide capsule that is cross-
15 reactive with host polysialic acid (i.e. serogroup B) and high antigenic mutability for the immunodominant noncapsular epitopes, i.e. epitopes of antigens that are present at the surface in relatively large quantities, are accessible to antibodies, and elicit a strong antibody response.

Prior efforts to develop broad spectrum vaccines have been hampered by the wide
20 variety of highly effective strategies used by *Neisserial* species to evade the human immune system. Because of these strategies, an immune response to a given strain will often not confer effective immunity against other strains of *Neisseria*. The present invention overcomes the disadvantages of prior art approaches to vaccination and elicits protective immunity against a broad spectrum of *Neisseria meningitidis* strains, notably (but not
25 exclusively) including strains belonging to serogroup B.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention generally provides methods and vaccines for the prevention of diseases caused by *Neisseria meningitidis* bacteria, particularly serogroup B strains.

30 In one embodiment, the method of the invention comprises: administering to a mammal a first preparation of i) outer membrane vesicles (OMV) of a first *Neisseria meningitidis* spp., and/or ii) microvesicles (MV) released into a culture medium during culture of a first *Neisseria meningitidis* spp., said administering of OMV and/or MV being in

a sufficient amount to immunologically prime and/or elicit an immune response to epitopes present in said first preparation; administering at least a second preparation of i) OMVs of a second *Neisseria meningitidis* spp., and/or ii) MVs released into a culture medium during culture of a second *Neisseria meningitidis* spp., said administering of OMV and/or MV
5 being in a sufficient amount to immunologically prime and/or elicit an immune response to epitopes present in said second preparation; and optionally, but preferably, administering a third preparation of i) OMV of a third *Neisseria meningitidis* spp., and/or ii) MV that are released into a culture medium during culture of a third *Neisseria meningitidis* spp., said administering of OMV and/or MV being in a sufficient amount to elicit an immune response
10 to epitopes present in said third preparation. Administration of the first, second, and (optionally) third preparation results in induction of an immune response to epitopes present in the preparations, wherein said response confers protective immunity against a disease caused by *Neisseria meningitidis* spp.

In preferred embodiments, the first, second, and third *Neisseria* strains are
15 genetically diverse to one another, e.g., the first strain is genetically diverse to the second strain, the third strain, or both the second and third strain.

In related embodiments, administration of the preparations is serial. Serial administration of the preparations can be conducted in any order. For example, the following orders of administration are within the scope of the invention (from left to right,
20 with the third administration being optional): OMV-OMV-OMV; OMV-OMV-MV; OMV-MV-MV; MV-MV-MV; MV-MV-OMV; MV-OMV-OMV; OMV-MV-OMV; and MV-OMV-MV. Preferably, the order of administration is MV-MV-OMV.

In other related embodiments, the preparations are administered as a mixture, where the initial administration of the mixture can be followed by one or more additional
25 administrations of the same or different mixture to serve as boosters.

In one specific embodiment, the invention involves serially administering microvesicles (MV) that bleb naturally during growth of *Neisseria meningitidis* and are released in the culture medium (collected by separating the larger cells from the smaller blebs and then pelleting the blebs) and/or outer membrane vesicles (OMV, prepared directly
30 from isolated outer membrane fractions). The OMVs and MVs are prepared from "genetically diverse" strains of *Neisseria meningitidis*, for example, strains that differ from one another in at least one of serotype or serosubtype, and may be diverse at multiple genetic loci, e.g., differ in both serotype and serosubtype, e.g., having different outer membrane

Porin, PorA and PorB proteins. Further, the OMV and/or MV preparations can be given sequentially in at least two, and preferably at least three administrations (e.g., injections) of OMVs or MVs from genetically diverse strains; four, five, six or more administrations are also contemplated.

5 In another specific embodiment, the first *Neisseria meningitidis* spp. is a member of a first serosubtype; the second *Neisseria meningitidis* spp. is a member of a second serosubtype, which second serosubtype are different from the serosubtype of the first *Neisseria meningitidis* spp, and, where used, the third *Neisseria meningitidis* spp. is a member of a third serosubtype, which third serosubtype is different from the serosubtype of
10 at least the first, and preferably both the first and the second, *Neisseria meningitidis* spp.

In still another specific embodiment, the first *Neisseria meningitidis* spp. is a member of a first serotype and of a first serosubtype; the second *Neisseria meningitidis* spp. is a member of a second serotype and of a second serosubtype, which second serotype and second serosubtype are different from the serotype and serosubtype of the first *Neisseria*
15 *meningitidis* spp, and, where used, the third *Neisseria meningitidis* spp. is a member of a third serotype and of a third serosubtype, which third serotype and third serosubtype are different from the serotype and serosubtype of at least the first, and preferably both the first and the second, *Neisseria meningitidis* spp.

In one specific embodiment of the invention, a first administration is with
20 microvesicles (MVs) prepared from a serogroup C strain (e.g. RM1090 (C:2a:P1.5,2:L3,7)). The second administration is with MVs prepared from a second strain (e.g. BZ198 (B:NT:P1.4)), and the third administration is with outer membrane vesicles (OMVs) prepared from a third strain (e.g. Z1092 (A:4,21:P1.10)). Sequential immunization with vesicles and/or microvesicles prepared from genetically diverse *Neisseria meningitidis*
25 strains is referred to hereafter as the "CHORI vaccine" or "CHORI antigen." Immunization with a mixture of the first, second, and third preparations of the CHOR vaccine is referred to as "CHORI mix".

In other aspects, the invention features a composition comprising a first preparation selected from the group consisting of outer membrane vesicle (OMV), microvesicles (MV),
30 or both OMV and MV from a first from a first *Neisseria meningitidis* species; a second preparation selected from the group consisting of outer membrane vesicle (OMV), microvesicles (MV), or both OMV and MV from a second *Neisseria meningitidis* species,

wherein the second *Neisseria meningitidis* spp is genetically diverse to the first *Neisseria meningitidis* species; and a pharmaceutically acceptable carrier.

In related embodiments, the composition further comprises a third preparation selected from the group consisting of outer membrane vesicle (OMV), microvesicles (MV),
5 or both OMV and MV from a third *Neisseria meningitidis* species, wherein the third *Neisseria meningitidis* species is genetically diverse to the first *Neisseria meningitidis* species. In specific embodiments, the first preparation of the composition comprises MV, the second preparation comprises MV; and the third preparation comprises OMV.

Preferably, the first and second *Neisseria meningitidis* species are genetically diverse in that
10 they differ in at least one of serotype or serosubtype, and, where included, the third and the first *Neisseria meningitidis* species are genetically diverse in that they differ in at least one of serotype or serosubtype.

In still other aspects, the invention features a composition comprising at least one isolated *Neisseria meningitidis* antigen, the isolated antigen being present in the composition
15 in an amount effective to elicit an immune response in a mammalian host, and being characterized as a protein immunoprecipitated with anti-sera produced following vaccination with the CHORI-vaccine, and having an apparent molecular mass selected from the group consisting of about 80 kDa, about 59.5 kDa, about 40.7 kDa, about 39.6 kDa, about 33 kDa, about 27.9 kDa, and 14.5 kDa; and a pharmaceutically acceptable excipient.

In another aspect, the invention features a composition comprising at least one isolated *Neisseria meningitidis* antigen, the isolated antigen being present in the composition
20 in an amount effective to elicit an immune response in a mammalian host, and being characterized as a protein detected by Western blot with anti-sera produced following vaccination of a mammal with the CHORI vaccine, and having an apparent molecular mass
25 selected from the group consisting of about 53 kDa to 57 kDa; about 46-47 kDa, about 33 kDa, about 20 kDa to 21 kDa; and about 18 kDa; and a pharmaceutically acceptable excipient.

In another aspect the invention features a composition comprising at least one isolated *Neisseria meningitidis* antigen, the isolated antigen being present in the composition
30 in an amount effective to elicit an immune response in a mammalian host, wherein the antigen is from a protein that specifically binds a monoclonal antibody selected from the group consisting of 1D9, 4B11, 9B8, and 14C7 (which antibodies are described herein and deposited with the ATCC); and a pharmaceutically acceptable excipient.

In preferred embodiments, the compositions having isolated antigens comprise at least two isolated *Neisseria meningitidis* antigens.

In related aspects, the invention features methods for eliciting broad spectrum protective immunity against a disease caused by a *Neisseria meningitidis* species, said method comprising administering to a mammal at least one of the compositions comprising isolated antigens as described above.

Preferably, the antigen compositions (e.g., OMV/MV preparations, isolated protein preparations) may be administered to mammals, especially humans, that are immunologically naïve with respect to *Neisseria meningitidis* (i.e., have not been exposed to antigens from *Neisseria meningitidis*, or have not been exposed insufficient amounts to elicit a protective immune response). A specific embodiment of the invention involves administration to human infants that are about five years old or younger, especially two years old or younger.

In some embodiments of the invention, prior to administration of antigen compositions from *Neisseria meningitidis*, the individuals may have been primed by exposure (through natural infection or administration) to a *Neisserial* species other than *Neisseria meningitidis* (or an antigen composition prepared from a *Neisserial* species).

Antisera obtained from mice immunized as described above bind to the bacterial cell surface of a group of genetically diverse *Neisseria meningitidis* serogroup B strains, as determined by flow cytometric detection of indirect immunofluorescence. In one example, sera from immunized mice were positive for eleven of 12 strains tested. These 11 included 3 meningococcal B strains with respective PorA and PorB proteins that were heterologous to those of the meningococcal strains used to prepare the immunogens used for vaccination. (By way of contrast, antisera from animals immunized with two injections of the above-described "Norwegian OMV vaccine" reacted by flow cytometry with only 5 of 11 strains. All 5 had PorA and/or PorB proteins that were the same or closely related to those in the "Norwegian" OMV vaccine.) The antisera from animals immunized with the "CHORI vaccine" also elicited complement-mediated bacteriolysis in 11 of 12 strains, a good predictor of protection against disease in humans (Goldschneider et al, 1969, J. Exp. Med. 129:1307). Antibody binding to the bacterial cell surface, or complement-mediated bacteriolysis, was not inhibited by the presence of excess soluble serogroup B polysaccharide, evidence that the protective antibodies were directed against non-capsular antigens.

Antisera from mice immunized in a second example using the CHORI vaccine were bactericidal against 14 of 14 strains tested including eight strains with serosubtypes that were heterologous from those used in the vaccine preparations. In a third example, antisera prepared from guinea pigs immunized with the CHORI vaccine were bactericidal against 9 of 10 strains tested including 5 strains with serosubtypes that were heterologous to those expressed by the vaccine strains. Antisera to the CHORI vaccine prepared in mice in the first example and in guinea pigs in the third example also were highly protective against bacteremia in the infant rats challenged with serogroup B bacteria. The immunization protocol used herein generally induces the immune system to converge on non-capsular antigens that are common to the strains from which the MVs and OMVs are obtained. The CHORI vaccine elicits antibodies against multiple cell surface epitopes, including, PorA, possibly PorB, and conserved proteins such as Neisserial surface protein A (NspA), the class 4 protein, (reduction modifiable protein, Rmp) and other noncapsular antigens as yet unidentified.

In general, the vaccines of the present invention that employ sequential immunization with antigenic material prepared from different strains (genetically diverse) have the potential to confer protection against the majority of *Neisseria meningitidis* serogroup B strains. This approach also has broad applicability for vaccination against *Neisseria meningitidis* strains representative of other serogroups such as A, C, Y, or W-135, and also against other members of the genus *Neisseria*.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 summarizes the results of meningococcal outer membrane vesicle vaccine efficacy trials.

Figure 2 is a photograph of a 15% SDS-PAGE gel of microvesicle (MV), deoxycholate extracted microvesicle (DOC MV), outermembrane vesicle (OMV), and deoxycholate extracted outermembrane vesicle (DOC OMV) vaccine preparations from meningococcal strains Z1092 (A:4,21:P1.10), BZ198 (B:NT:P.1.4), and RM1090 (C:2a:P1.2), respectively. Lane 1, molecular mass standards. Lane 2, Z1092 MV. Lane 3, Z1092 DOC MV. Lane 4, Z1092 OMV. Lane 5, Z1092 DOC OMV. Lane 6, BZ198 MV. Lane 7, BZ198 DOC MV. Lane 8, BZ198 OMV. Lane 9, BZ198 DOC OMV. Lane 10, RM1090 MV. Lane 11, RM1090 DOC MV. Lane 12, RM1090 OMV. Lane 13, RM1090 DOC OMV.

Figure 3 is a series of graphs showing binding of anti-CHORI vaccine, anti-Norwegian vaccine and control antisera and mAb to live encapsulated meningococcal B strains MC58 (B:15:P1.7,16) and S3446 (B:19,14:P1.23,14), as determined by indirect fluorescence flow cytometry. All antisera were tested at dilutions of 1:20. The control mAb is an anti-capsule-specific murine mAb (Granoff et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 5028-5036). The control antisera were pooled sera from mice immunized with proteins from the supernatant culture of *E. coli* strain BL21 or guinea pigs immunized with the adjuvant, aluminum hydroxide, alone. Note that the strain MC58 has the same serotype and serosubtype as the strain used to prepare OMV for the Norwegian vaccine. The serotype and serosubtype of strain S3446 is heterologous to the strains used to prepare both vaccines.

Figure 4 presents data regarding the bacterial cell surface binding of antisera determined by indirect fluorescence flow cytometry

Figure 5 presents data illustrating the reactivity of CHORI antisera against *N. meningitidis* serogroup A and C strains.

Figure 6 summarizes the results of a bactericidal assay testing anti-CHORI vaccine, anti-rNspA, and anti-Norwegian vaccine antisera against meningococcal B strain 2996.

Figure 7 provides data showing the complement-mediated bactericidal activity of antisera and antibodies.

Figure 8 provides data showing the complement-mediated bactericidal activity of antisera from mice immunized with the indicated vaccines.

Figure 9 provides data showing the bactericidal activity of antisera from guinea pigs immunized with the indicated vaccines.

Figure 10 provides data showing the passive protection in infant rats against meningococcal B strain 8047 bacteremia by antisera and antibodies.

Figure 11 provides data showing the passive protection in infant rats against meningococcal B strain 8047 bacteremia by guinea pig antisera.

Figure 12 is a photograph of a silver stained 15% SDS-PAGE gel of surface-exposed proteins precipitated by anti-CHORI antigen antisera from non-encapsulated meningococcal B strain M7. Lane 1, total protein from M7. Lane 2, proteins precipitated by murine anti-CHORI antisera. Lane 3, proteins precipitated by murine negative control antisera. The numbers on the left of the figure indicate apparent molecular mass in kDa.

Figure 13 is a photograph of a Western blot of a 15% SDS-PAGE gel of surface-exposed proteins precipitated by anti-CHORI antigen antisera from non-encapsulated

meningococcal B strain M7. Lanes 1 and 4, total protein from M7. Lanes 2 and 5, proteins precipitated by murine anti-CHORI antigen antisera. Lanes 3 and 6, proteins precipitated by murine negative control antisera. Anti-CHORI antigen antisera were used as the primary detecting antibody in lanes 1 to 3 and an anti-PorA mAb MN16C13F4 (Rijkainstituut Voor
 5 Volksgezondheid en Mileu, Biltoven, The Netherlands) that is specific for serosubtype P1.2 was used as the primary detecting antibody in lanes 4 to 5.

Figure 14 provides data showing the bacterial surface accessible proteins precipitated by pooled antisera from mice sequentially immunized with MenC strain RM1090 MV, MenB strain BZ198 MV, and MenA strain Z1092 OMV.

10 Figure 14A provides additional examples of data showing the bacterial surface accessible proteins precipiated by pooled anitsera from mice sequentially immunized with MenC strain RM1090 MV, MenB strain BZ198 MV, and MenA strain Z1092 OMV.

Figure 15 is a photograph of a Western blot of a 15% SDS-PAGE gel of MV or OMV preparations. Primary detecting antisera is pooled mouse anti-CHORI/CFA vaccine
 15 antisera in lanes 1 to 3, pooled mouse anti-CHORI/ $Al_2(OPO_3)_3$ in lanes 4 and 5, and pooled guinea pig anti-CHORI/ $Al_2(OPO_3)_3$ in lanes 6 to 8. Lanes 1 and 6, MV proteins prepared from strain RM1090. Lanes 2, 4, and 7, MV proteins prepared from strain BZ198. Lanes 3, 5, and 8, OMV proteins prepared from strain Z1092. The numbers on the left of the figure indicate apparent molecular mass in kDa.

20 Figure 16 provides data showing the apparent molecular masses of proteins from the indicated MV or OMV preparations that are reactive with antisera from mice and guinea pigs that were sequentially immunized with MV from MenC strain RM1090 and MenB strain BZ198, and OMV from MenA strain Z1092.

Figure 17 provides data from ELISA showing the absorption of anti-LOS antibodies
 25 from pooled antisera obtained from mice and guinea pigs sequentially immunized with MV from MenC strain RM1090 and MenB strain BZ198, and OMV from MenA strain Z1092, or three injections of a mixture of the three vesicle preparations.

Figure 18 provides data from complement-mediated bactericidal assay showing that
 30 the absorption of anti-LOS antibodies from pooled antisera obtained from mice and guinea pigs sequentially immunized with MV from MenC strain RM1090 and MenB strain BZ198, and OMV from MenA strain Z1092, or three injections of a mixture of the three vesicle preparations does not significantly change the bactericidal activity of the antisera against MenB strains that are homologous or heterologous to the vaccine strains.

Figure 19 provides data from a whole cell ELISA showing examples of mAbs produced from mice sequentially immunized with MV from MenC strain RM1090 and MenB strain BZ198, and OMV from MenA strain Z1092. Several mAbs are reactive with all meningococcal strains tested and others react with a limited subset of strains.

5 Figure 20 summarizes the complement-mediated bactericidal activity of mAbs prepared from mice immunized with anti-CHORI antigen and tested against several MenB strains.

Figure 21 summarizes the meningococcal serotype and serosubtype defining monoclonal antibodies available from RIVM

10 Figure 22 summarizes the serogroup, serotype, and serosubtype defining monoclonal antibodies available from NIBSC

Before the present invention and specific exemplary embodiments of the invention are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular
15 embodiments described, as such may, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting, since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims.

Where a range of values is provided, it is understood that each intervening value, to
20 the tenth of the unit of the lower limit unless the context clearly dictates otherwise, between the upper and lower limit of that range and any other stated or intervening value in that stated range is encompassed within the invention. The upper and lower limits of these smaller ranges may independently be included in the smaller ranges is also encompassed within the invention, subject to any specifically excluded limit in the stated range. Where
25 the stated range includes one or both of the limits, ranges excluding either both of those included limits are also included in the invention.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described
30 herein can also be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated herein by reference to disclose and describe the methods and/or materials in connection with which the publications are cited.

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "and", and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "an antigen" includes a plurality of such antigens and reference to "the vesicle" includes reference to one or more vesicles and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth.

The publications discussed herein are provided solely for their disclosure prior to the filing date of the present application. Nothing herein is to be construed as an admission that the present invention is not entitled to antedate such publication by virtue of prior invention. Further, the dates of publication provided may be different from the actual publication dates which may need to be independently confirmed.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Immunization of infants, older children and adults with meningococcal outer membrane vesicle (OMV) vaccines induces serum bactericidal antibodies, a serological correlate of protection against disease (Goldschneider et al, 1969, J. Exp. Med. 129:1307). The efficacy of OMV vaccines for prevention of meningococcal B disease also has been demonstrated directly in older children and adults in randomized, prospective clinical trials, and in retrospective case-control studies. See, e.g., results summarized in background section and in Figure 1. Thus, the clinical effectiveness of outer membrane vesicle vaccines is not in dispute. Such vaccines are close to licensure for use in Norway in older children and adults, and are in late-stage clinical development for licensure in other European countries. An OMV vaccine prepared by the Finley Institute in Cuba also is available commercially and has been given to millions of children in South America.

The serum bactericidal antibody response to OMV vaccines tends to be strain specific (Tappero et al., 1999, JAMA 281:1520; and Roupe van der Voort ER, 2000, Vaccine, 18:1334-1343). PorA is immunodominant, and the immunity induced is predominantly specific to the strains from which the membrane vesicles were obtained (Tappero et al., 1999, JAMA 281:1520; Martin SL et al, 2000, Vaccine, 18:2476-2481). This limitation is primarily because of antigenic variability of the PorA protein and is particularly true in infants who are immunologically naïve (Tappero et al.) with respect to prior exposure to neisserial antigens.

Hence, the present invention involves eliciting an immune response that is broadly reactive with diverse disease-producing *N. meningitidis* strains. The invention circumvents

contemplates and encompasses a vaccine or vaccination regimen that confers protection against a disease caused by a member of serogroup B of *Neisseria meningitidis* and also against other serogroups, particularly serogroups A, C, Y and W-135.

The phrase "specifically binds to an antibody" or "specifically immunoreactive with", when referring to an antigen such as a polysaccharide, phospholipid, protein or peptide, refers to a binding reaction which is based on and/or is probative of the presence of the antigen in a sample which may also include a heterogeneous population of other molecules. Thus, under designated immunoassay conditions, the specified antibody or antibodies bind(s) to a particular antigen or antigens in a sample and do not bind in a significant amount to other molecules present in the sample. Specific binding to an antibody under such conditions may require an antibody or antiserum that is selected for its specificity for a particular antigen or antigens.

The phrase "in a sufficient amount to elicit an immune response to epitopes present in said preparation" means that there is a detectable difference between an immune response indicator measured before and after administration of a particular antigen preparation. Immune response indicators include but are not limited to: antibody titer or specificity, as detected by an assay such as enzyme-linked immunoassay (ELISA), bactericidal assay, flow cytometry, immunoprecipitation, Ouchter-Lowny immunodiffusion; binding detection assays of, for example, spot, Western blot or antigen arrays; cytotoxicity assays, etc.

A "surface antigen" is an antigen that is present in a surface structure of *Neisseria meningitidis* (e.g. the outer membrane, inner membrane, periplasmic space, capsule, pili, etc.).

The phrase "genetically diverse" as used in the context of genetically diverse strains of *Neisseria meningitidis*, refers to strains that differ from one another in the amino acid sequence of at least one, and usually at least two, more usually at least three polypeptides, particularly antigenic polypeptides. Genetic diversity of strains can be accomplished by selecting strains that differ in at least one or more, preferably at least two or more, of serogroup, serotype, or serosubtype (e.g., two strains that differ in at least one of the proteins selected from outer membrane, PorA and PorB proteins, are said to genetically diverse with respect to one another). Genetic diversity can also be defined by, for example, multi-locus sequence typing and/or multi-locus enzyme typing (see, e.g., Maiden et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140; Pizza et al. 2000 *Science* 287:1816), multi-locus enzyme electrophoresis, and other methods known in the art.

the problem of immunodominance of antigenically variable domains of PorA in vesicle- or PorA-based vaccines by focusing the antibody response on common antigens in the vaccine strains. Importantly, the methods of the invention elicit serum bactericidal antibody, the only proven serologic correlate of protection in humans (Goldschneider et al. 1969, *supra*), against strains of *Neisseria* expressing serosubtype epitopes that were not used in the vaccine preparations. Further, the method elicits serum bactericidal antibody against strains that are not killed by antibody to a conserved protein such as Neisserial surface protein A, a candidate meningococcal vaccine (Martin et al., 2000. J. Biotechnol. 83:27-31; Moe et al. (1999 Infect. Immun. 67: 5664; Moe et al. Infect Immun. 2001 69:3762). Without being held to theory, the vaccine and immunization regimen of the invention provides its unexpected advantages in broad spectrum protective immunity by eliciting antibodies that are specific for both conserved and non-conserved antigens.

A. Definitions

The term "protective immunity" means that a vaccine or immunization schedule that is administered to a mammal induces an immune response that prevents, retards the development of, or reduces the severity of a disease that is caused by *Neisseria meningitidis*, or diminishes or altogether eliminates the symptoms of the disease.

The phrase "a disease caused by a strain of serogroup B of *Neisseria meningitidis*" encompasses any clinical symptom or combination of clinical symptoms that are present in an infection with a member of serogroup B of *Neisseria meningitidis*. These symptoms include but are not limited to: colonization of the upper respiratory tract (e.g. mucosa of the nasopharynx and tonsils) by a pathogenic strain of serogroup B of *Neisseria meningitidis*, penetration of the bacteria into the mucosa and the submucosal vascular bed, septicemia, septic shock, inflammation, haemorrhagic skin lesions, activation of fibrinolysis and of blood coagulation, organ dysfunction such as kidney, lung, and cardiac failure, adrenal hemorrhaging and muscular infarction, capillary leakage, edema, peripheral limb ischaemia, respiratory distress syndrome, pericarditis and meningitis.

The phrase "broad spectrum protective immunity" means that a vaccine or immunization schedule elicits "protective immunity" against at least one or more (or against at least two, at least three, at least four, at least five, against at least eight, or at least against more than eight) strains of *Neisseria meningitidis*, wherein each of the strains belongs to a different serosubtype as the strains used to prepare the vaccine. The invention specifically

contemplates and encompasses a vaccine or vaccination regimen that confers protection against a disease caused by a member of serogroup B of *Neisseria meningitidis* and also against other serogroups, particularly serogroups A, C, Y and W-135.

5 The phrase “specifically binds to an antibody” or “specifically immunoreactive with”, when referring to an antigen such as a polysaccharide, phospholipid, protein or peptide, refers to a binding reaction which is based on and/or is probative of the presence of the antigen in a sample which may also include a heterogeneous population of other molecules. Thus, under designated immunoassay conditions, the specified antibody or antibodies bind(s) to a particular antigen or antigens in a sample and do not bind in a
10 significant amount to other molecules present in the sample. Specific binding to an antibody under such conditions may require an antibody or antiserum that is selected for its specificity for a particular antigen or antigens.

15 The phrase “in a sufficient amount to elicit an immune response to epitopes present in said preparation” means that there is a detectable difference between an immune response indicator measured before and after administration of a particular antigen preparation. Immune response indicators include but are not limited to: antibody titer or specificity, as detected by an assay such as enzyme-linked immunoassay (ELISA), bactericidal assay, flow cytometry, immunoprecipitation, Ouchter-Lowny immunodiffusion; binding detection assays of, for example, spot, Western blot or antigen arrays; cytotoxicity assays, etc.

20 A “surface antigen” is an antigen that is present in a surface structure of *Neisseria meningitidis* (e.g. the outer membrane, inner membrane, periplasmic space, capsule, pili, etc.).

25 The phrase “genetically diverse” as used in the context of genetically diverse strains of *Neisseria meningitidis*, refers to strains that differ from one another in the amino acid sequence of at least one, and usually at least two, more usually at least three polypeptides, particularly antigenic polypeptides. Genetic diversity of strains can be accomplished by selecting strains that differ in at least one or more, preferably at least two or more, of serogroup, serotype, or serosubtype (e.g., two strains that differ in at least one of the proteins selected from outer membrane, PorA and PorB proteins, are said to genetically diverse with
30 respect to one another). Genetic diversity can also be defined by, for example, multi-locus sequence typing and/or multi-locus enzyme typing (see, e.g., Maiden et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140; Pizza et al. 2000 *Science* 287:1816), multi-locus enzyme electrophoresis, and other methods known in the art.

"Serogroup" as used herein refers to classification of *Neisseria meningitidis* by virtue of immunologically detectable variations in the capsular polysaccharide. About 12 serogroups are known: A, B, C, X, Y, Z, 29-E, W-135, H, I, K and L. Any one serogroup can encompass multiple serotypes and multiple serosubtypes.

5 "Serotype" as used herein refers to classification of *Neisseria meningitidis* strains based on monoclonal antibody defined antigenic differences in the outer membrane protein Porin B. A single serotype can be found in multiple serogroups and multiple serosubtypes.

"Serosubtype" as used herein refers classification of *Neisseria meningitidis* strains based on antibody defined antigenic variations on an outer membrane protein called Porin A, or upon VR typing of amino acid sequences deduced from DNA sequencing (Sacchi et al., 10 2000, *J. Infect. Dis.* 182:1169; see also the Multi Locus Sequence Typing web site). Most variability between PorA proteins occurs in two (loops I and IV) of eight putative, surface exposed loops. The variable loops I and IV have been designated VR1 and VR2, respectively. A single serosubtype can be found in multiple serogroups and multiple 15 serotypes.

"Enriched" means that an antigen in an antigen composition is manipulated by an experimentalist or a clinician so that it is present in at least a three-fold greater concentration by total weight, preferably at least 10-fold greater concentration, more preferably at least 100-fold greater concentration, and most preferably at least 1,000-fold greater concentration 20 than the concentration of that antigen in the strain from which the antigen composition was obtained. Thus, if the concentration of a particular antigen is 1 microgram per gram of total bacterial preparation (or of total bacterial protein), an enriched preparation would contain at least 3 micrograms per gram of total bacterial preparation (or of total bacterial protein).

The term "immunologically naïve with respect to *Neisseria meningitidis*" denotes an 25 individual (e.g., a mammal such as a human patient) that has never been exposed (through infection or administration) to *Neisseria meningitidis* or to an antigen composition derived from *Neisseria meningitidis* in sufficient amounts to elicit protective immunity, or if exposed, failed to mount a protective immune response. (An example of the latter would be an individual exposed at a too young age when protective immune responses may not occur. 30 Molages et al., 1994, *Infect. Immun.* 62: 4419-4424). It is further desirable (but not necessary) that the "immunologically naïve" individual has also not been exposed to a *Neisserial* species other than *Neisseria meningitidis* (or an antigen composition prepared from a *Neisserial* species), particularly not to a cross-reacting strain of *Neisserial* species (or

antigen composition). Individuals that have been exposed (through infection or administration) to a *Neisserial* species or to an antigen composition derived from that *Neisserial* species in sufficient amounts to elicit an immune response to the epitopes exhibited by that species, are "primed" to immunologically respond to the epitopes exhibited by that species.

B. Preparation of *Neisseria meningitidis* fractions and detection of antigens and antigenic compositions that confer protective immunity

1. Antigenic compositions

The various antigenic compositions (e.g. lysed cells, subcellular fractions, MVs and OMVs, or individual antigens and combinations of antigens detected and isolated as described above and below) that are administered to an animal (especially a human patient) to induce an immune response are generally obtained by methods known in the art. In some embodiments, the antigen preparations used to elicit an immune response are prepared by culturing *Neisseria meningitidis* spp. using well-known bacterial culture techniques and preparing a fraction that contains antigens that induce protective immunity.

One preferred fraction comprises microvesicles (MV) or blebs that are released during culture of said *Neisseria meningitidis* spp. MVs may be obtained by culturing a strain of *Neisseria meningitidis* in broth culture medium, separating whole cells from the broth culture medium (e.g. by filtration, or by a low-speed centrifugation that pellets only the cells and not the smaller blebs, or the like), and then collecting the MVs that are present in the cell-free culture medium (e.g. by filtration, differential precipitation or aggregation of MVs, or by a high-speed centrifugation that pellets the blebs, or the like). Strains for use in production of MVs can generally be selected on the basis of the amount of blebs produced in culture (e.g., bacteria can be cultured in a reasonable number to provide for production of blebs suitable for isolation and administration in the methods described herein). An exemplary strain that produces high levels of blebs is described in PCT Publication No. WO 01/34642. In addition to bleb production, strains for use in MV production may also be selected on the basis of NspA production, where strains that produce higher levels of NspA may be preferable (for examples of *N. meningitidis* strains having different NspA production levels, see, e.g., Moe et al. (1999 Infect. Immun. 67: 5664).

A second preferred fraction comprises outer membrane vesicles (OMV) prepared from the outer membrane of a cultured strain of *Neisseria meningitidis* spp. OMVs may be obtained from a *Neisseria meningitidis* grown in broth or solid medium culture, preferably

by separating the bacterial cells from the culture medium (e.g. by filtration or by a low-speed centrifugation that pellets the cells, or the like), lysing the cells (e.g. by addition of detergent, osmotic shock, sonication, cavitation, homogenization, or the like) and separating an outer membrane fraction from cytoplasmic molecules (e.g. by filtration; or by differential precipitation or aggregation of outer membranes and/or outer membrane vesicles, or by affinity separation methods using ligands that specifically recognize outer membrane molecules; or by a high-speed centrifugation that pellets outer membranes and/or outer membrane vesicles, or the like); outer membrane fractions may be used to produce OMVs.

In the production of MVs or OMVs, it may be preferable to use strains that are relatively low producers of endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) so as to decrease the need to remove endotoxin from the final preparation prior to use in humans. For example, the OMV and/or MV can be prepared from mutants of these *Neisseria* strains in which lipooligosaccharide or other antigens that may be undesirable in a vaccine (e.g. Rmp) is reduced or eliminated.

Where desired (e.g., where the strains used to produce MVs or OMVs are associated with endotoxin or particular high levels of endotoxin), the MVs or OMVs are optionally treated to reduce endotoxin, e.g., to reduce toxicity following administration. Reduction of endotoxin can be accomplished by extraction with a suitable detergent (for example, BRIJ-96, sodium deoxycholate, sodium lauroylsarcosinate, Empigen BB, Triton X-100, TWEEN 20 (sorbitan monolaurate polyoxyethylene), TWEEN 80, at a concentration of 0.1-10%, preferably 0.5-2%). Where detergent extraction is used, it is preferable to use a detergent other than deoxycholate. Extraction of OMV and MV preparations with deoxycholate resulted in removal of some non-capsular protein antigens (see Figure 2). Vaccination of animals with OMV or MV preparations subjected to deoxycholate extraction elicited an immune response that was associated with lower titers of bactericidal antibodies compared to vaccination with non-deoxycholate-extracted material.

In addition to MVs or OMVs, isolated antigens or particular combinations of antigens may be used to induce a protective immune response. The identity of the isolated antigens or combinations of antigens are described below.

Immunogenic compositions used as vaccines comprise an immunologically effective amount of antigen, as well as any other compatible components, as needed. By "immunologically effective amount" is meant that the administration of that amount to an individual, either in a single dose or as part of a series, is effective for treatment or

prevention. This amount varies depending upon the health and physical condition of the individual to be treated, age, the taxonomic group of individual to be treated (e.g., non-human primate, primate, *etc.*), the capacity of the individual's immune system to synthesize antibodies, the degree of protection desired, the formulation of the vaccine, the treating clinician's assessment of the medical situation, and other relevant factors. It is expected that the amount will fall in a relatively broad range that can be determined through routine trials. Dosage treatment may be a single dose schedule or a multiple dose schedule (e.g., including booster doses). The vaccine may be administered in conjunction with other immunoregulatory agents.

The antigen compositions or individual antigens to be administered are provided in a pharmaceutically acceptable solution such as an aqueous solution, often a saline solution, or they can be provided in powder form. The compositions may also include an adjuvant. Examples of known suitable adjuvants that can be used in humans include, but are not necessarily limited to, alum, aluminum phosphate, aluminum hydroxide, MF59 (4.3% w/v squalene, 0.5% w/v Tween 80, 0.5% w/v Span 85), CpG-containing nucleic acid (where the cytosine is unmethylated), QS21, MPL, 3DMPL, extracts from Aquilla, ISCOMS, LT/CT mutants, poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLG) microparticles, Quil A, interleukins, and the like. For experimental animals, one can use Freund's, N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (CGP 11637, referred to as nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (CGP 19835A, referred to as MTP-PE), and RIBI, which contains three components extracted from bacteria, monophosphoryl lipid A, trehalose dimycolate and cell wall skeleton (MPL+TDM+CWS) in a 2% squalene/Tween 80 emulsion. The effectiveness of an adjuvant may be determined by measuring the amount of antibodies directed against the immunogenic antigen.

Further exemplary adjuvants to enhance effectiveness of the composition include, but are not limited to: (1) oil-in-water emulsion formulations (with or without other specific immunostimulating agents such as muramyl peptides (see below) or bacterial cell wall components), such as for example (a) MF59™ (W090/14837; Chapter 10 in *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), containing 5% Squalene, 0.5% Tween 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing MTP-PE) formulated into submicron particles using a microfluidizer, (b) SAF, containing 10% Squalene, 0.4% Tween 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP either microfluidized into a submicron

emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion, and (c) Ribi™ adjuvant system (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) containing 2% Squalene, 0.2% Tween 80, and one or more bacterial cell wall components such as monophosphorylipid A (MPL), trehalose dimycolate (TDM), and cell wall skeleton (CWS), preferably MPL + CWS (Detox™); (2) saponin

5 adjuvants, such as QS21 or Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) may be used or particles generated therefrom such as ISCOMs (immunostimulating complexes), which ISCOMS may be devoid of additional detergent e.g. WO00/07621; (3) Complete Freund's Adjuvant (CFA) and Incomplete Freund's Adjuvant (IFA); (4) cytokines, such as interleukins (e.g. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636), etc.), interferons (e.g. gamma interferon), macrophage

10 colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF), etc.; (5) monophosphoryl lipid A (MPL) or 3-O-deacylated MPL (3dMPL) e.g. GB-2220221, EP-A-0689454, optionally in the substantial absence of alum when used with pneumococcal saccharides e.g. WO00/56358; (6) combinations of 3dMPL with, for example, QS21 and/or oil-in-water emulsions e.g. EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleotides comprising CpG motifs [Krieg *Vaccine* 2000,

15 19, 618-622; Krieg *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 870-876; Chu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224, Krieg *et al.*, *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157,

20 1840-1845; Cowdery *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, *Cell Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; and Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906;

25 International patent applications WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 and WO98/52581] i.e. containing at least one CG dinucleotide, where the cytosine is unmethylated; (8) a polyoxyethylene ether or a polyoxyethylene ester e.g. WO99/52549; (9) a polyoxyethylene sorbitan ester surfactant in combination with an octoxynol (WO01/21207) or a polyoxyethylene alkyl ether or ester surfactant in combination with at least

30 one additional non-ionic surfactant such as an octoxynol (WO01/21152); (10) a saponin and an immunostimulatory oligonucleotide (e.g. a CpG oligonucleotide) (WO00/62800); (11) an immunostimulant and a particle of metal salt e.g. WO00/23105; (12) a saponin and an oil-in-water emulsion e.g. WO99/11241; (13) a saponin (e.g. QS21) + 3dMPL + IM2 (optionally + a sterol)

e.g. WO98/57659; (14) other substances that act as immunostimulating agents to enhance the efficacy of the composition. Muramyl peptides include N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-25 acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine MTP-PE), etc.

The antigens may be combined with conventional excipients, such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talcum, cellulose, glucose, sucrose, magnesium, carbonate, and the like. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH adjusting and buffering agents, toxicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sodium lactate and the like. The concentration of antigen in these formulations can vary widely, and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, body weight and the like in accordance with the particular mode of administration selected and the patient's needs. The resulting compositions may be in the form of a solution, suspension, tablet, pill, capsule, powder, gel, cream, lotion, ointment, aerosol or the like.

The concentration of immunogenic antigens of the invention in the pharmaceutical formulations can vary widely, i.e. from less than about 0.1%, usually at or at least about 2% to as much as 20% to 50% or more by weight, and will be selected primarily by fluid volumes, viscosities, etc., in accordance with the particular mode of administration selected.

2. Immunization

The MVs, OMVs, isolated antigens, or combinations of antigens of the present invention are administered orally, nasally, nasopharyngeally, parenterally, enterically, gastrically, topically, transdermally, subcutaneously, intramuscularly, in tablet, solid, powdered, liquid, aerosol form, locally or systemically, with or without added excipients. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more detail in such publications as Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980). Administration of the MVs, OMVs, isolated antigens, or combinations of antigens can be performed serially or as a mixture, as described in more detail below.

It is recognized that the polypeptides and related compounds described above, when administered orally, must be protected from digestion. This is typically accomplished either by complexing the protein with a composition to render it resistant to acidic and enzymatic

hydrolysis or by packaging the protein in an appropriately resistant carrier such as a liposome. Means of protecting proteins from digestion are well known in the art.

In order to enhance serum half-life, the antigenic preparations that are injected may also be encapsulated, introduced into the lumen of liposomes, prepared as a colloid, or other conventional techniques may be employed which provide an extended serum half-life of the peptides. A variety of methods are available for preparing liposomes, as described in, e.g., Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980), U.S. Patents Nos. 4,235,871, 4,501,728 and 4,837,028. The preparations may also be provided in controlled release or slow-release forms for release and administration of the antigen preparations as a mixture or in serial fashion.

The compositions are administered to an animal that is at risk from acquiring a *Neisserial* disease to prevent or at least partially arrest the development of disease and its complications. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective dose." Amounts effective for therapeutic use will depend on, e.g., the antigen composition, the manner of administration, the weight and general state of health of the patient, and the judgment of the prescribing physician. Single or multiple doses of the antigen compositions may be administered depending on the dosage and frequency required and tolerated by the patient, and route of administration.

In particular embodiments, the antigen compositions described herein are administered serially. First, a therapeutically effective dose of a first antigen composition (e.g. MV, OMV, isolated antigen, or combinations of antigens, with or without excipients) prepared from a first *Neisserial* strain is administered to an individual. The first antigenic composition is generally administered in an amount effective to elicit an immune response (e.g., activation of B and/or T cells). Amounts for the initial immunization generally range from about 0.001 mg to about 1.0 mg per 70 kilogram patient, more commonly from about 0.001 mg to about 0.2 mg per 70 kilogram patient. Dosages from 0.001 up to about 10 mg per patient per day may be used, particularly when the antigen is administered to a secluded site and not into the blood stream, such as into a body cavity or into a lumen of an organ. Substantially higher dosages (e.g. 10 to 100 mg or more) are possible in oral, nasal, or topical administration.

After administration of the first antigen composition, a therapeutically effective dose of a second antigen composition (e.g. MV, OMV, isolated antigen, or combinations of antigens, with or without excipients) prepared from a second *Neisserial* strain is

administered to an individual after the individual has been immunologically primed by exposure to the first antigen composition. The booster may be administered days, weeks or months after the initial immunization, depending upon the patient's response and condition. The existence of an immune response to the first antigen composition may be determined by
5 known methods (e.g. by obtaining serum from the individual before and after the initial immunization, and demonstrating a change in the individual's immune status, for example an immunoprecipitation assay, or an ELISA, or a bactericidal assay, or a Western blot, or flow cytometric assay, or the like) and/or demonstrating that the magnitude of the immune response to the second injection is higher than that of control animals immunized for the first
10 time with the composition of matter used for the second injection (e.g. immunological priming). Immunologic priming and/or the existence of an immune response to the first antigen composition may also be assumed by waiting for a period of time after the first immunization that, based on previous experience, is a sufficient time for an immune response and/or priming to have taken place—e.g. 2, 4, 6, 10 or 14 weeks. Boosting dosages
15 of the second antigen composition are typically from about 0.001 mg to about 1.0 mg of antigen, depending on the nature of the immunogen and route of immunization.

In certain preferred embodiments, a therapeutically effective dose of a third antigen composition prepared from a third *Neisserial* strain is administered to an individual after the individual has been primed and/or mounted an immune response to the second antigen
20 composition. The third booster may be administered days, weeks or months after the second immunization, depending upon the patient's response and condition. The existence of priming and/or an immune response to the second antigen composition may be determined by the same methods used to detect an immune response to the second antigen composition. The existence of priming and/or an immune response to the second antigen composition may
25 also be assumed by waiting for a period of time after the second immunization that, based on previous experience, is a sufficient time for an immune response to have taken place—e.g. 2, 4, 6, 10 or 14 weeks. Boosting dosages of the second antigen composition are typically from about 0.001 mg to about 1.0 mg of antigen, depending on the nature of the immunogen and route of immunization. The present invention further contemplates the use of a fourth, fifth,
30 sixth or greater booster immunization, using either a fourth, fifth or sixth strain of *Neisseria meningitidis* or any of the first, second, or third strains, or other strain that is genetically diverse with respect to at least one of the first, second, and third strains.

The present invention also specifically contemplates that antigen compositions from other members of the genus *Neisseria* may be administered as described herein to generate protective immunity against *Neisseria meningitidis*. For example, *Neisseria lactamica*, a nonpathogenic non-encapsulated commensal member of the genus *Neisseria* that is commonly found in the human nasopharynx, encompasses strains which have many antigens present on *N. meningitidis* and, therefore, also may be used to prepare one of the immunogens envisioned in this invention. Thus, MVs and OMVs from the nonpathogenic *Neisseria lactamica* may be used to prime or elicit a protective immune response against *Neisseria meningitidis* (or against other pathogenic *Neisseria* such as *Neisseria gonorrhea*). This may be accomplished by initially administering an antigen composition (e.g., MV or OMV) from *Neisseria lactamica*, followed by administering a second and optionally a third antigen composition from *Neisseria meningitidis* (or *Neisseria gonorrhea*). The invention specifically contemplates also that antigen compositions from *Neisseria lactamica* strains be used for the initial, second and any subsequent administrations, wherein each *lactamica* strain has a different serotype and/or serosubtype as the others.

The invention also contemplates that the antigen compositions used at any step in the immunization protocol may be obtained from one or more strains of bacteria (especially *Neisseria lactamica* or *Neisseria meningitidis*) that are genetically engineered by known methods (see, e.g. U.S. Pat. No. 6,013,267) to express one or more nucleic acids that encode one or more molecules of interest, particularly molecules that elicit or enhance a protective immune response. The nucleic acids may, for example, encode Porin A, Porin B, NspA, pilin, or other *Neisserial* proteins. Other exemplary nucleic acids include those that encode *Neisserial* proteins immunoprecipitated with anti-sera produced following vaccination with the CHORI vaccine, particularly those proteins having apparent molecular masses of about 80 kDa, about 59.5 kDa, about 40.7 kDa, about 39.6 kDa, about 33 kDa, about 27.9 kDa, and 14.5 kDa, or antigenic fragments thereof. Further exemplary nucleic acids include those that encode *Neisserial* proteins detected by Western blot with anti-sera produced following vaccination with the CHORI vaccine, particularly those proteins having apparent molecular masses of about 53 kDa-57 kDa; about 46-47 kDa, about 33 kDa, about 20 kDa to 21 kDa; and about 18 kDa. The nucleic acids may encode any of the above proteins that is truncated, or altered to include or delete a glycosylation site, or to include or delete any epitope, or to increase the expression of any of the above proteins. Of particular interest are antigenic fragments of such proteins. In addition, the antigen compositions of the invention can

comprise additional antigens of *N. meningitidis* such as those exemplified in PCT Publication Nos. WO 99/24578, WO 99/36544; WO 99/57280, WO 00/22430, and WO 00/66791, as well as antigenic fragments of such proteins.

An important aspect of the present invention is that the antigen compositions used to prime and boost a broad protective immunity against *Neisseria meningitidis* are prepared from strains of *Neisseria* that possess variant immunodominant antigens (the main antigens that are routinely detected by antisera from different host animals that have been infected with *Neisseria*; representative examples include Porin A, Porin B, pilin, NspA etc.). In the examples described in the Examples section below, the strains vary with respect to either PorA or PorB, as evinced by their serotype or serosubtype. The strains also may vary with respect to the capsule molecule, as reflected by their serogroup.

Serotype and serosubtype classification is currently determined by detecting which of a panel of known monoclonals, which are known to recognize specific Porin molecules, bind to an unknown strain (Sacchi et al., 1998, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5:348, see Tables 8 and 9 for partial lists of monoclonals). It is probable that other such monoclonals will be identified. The use of any novel serotypes and serosubtypes which may be defined by any new monoclonals are specifically contemplated by the invention. In addition, serotypes and serosubtypes may be defined, not only by interaction with monoclonal antibodies, but also structurally by the absence and/or presence of defined peptide residues and peptide epitopes (Sacchi et al., 2000, *J. Infect. Dis.* 182:1169). Serotype and serosubtype classification schemes that are based on structural features of the Porins (known or that may be discovered at a later date) are specifically encompassed by the invention.

One purpose and effect of serial administration of antigen compositions from different strains is to potentiate an immune response to antigens and epitopes that are typically not immunodominant, particularly non-immunodominant epitopes that exhibit less genetic variability than the known immunodominant epitopes. The invention specifically encompasses the serial administration of antigen compositions from *Neisseria* strains that differ with respect to immunodominant antigens other than the Porins (e.g., phospholipids, polysaccharides, lipopolysaccharides, pilins, OmpA, Opa, Opc, etc.).

The antigen compositions are typically administered to a mammal that is immunologically naïve with respect to *Neisseria meningitidis*. In a particular embodiment, the mammal is a human child about five years or younger, and preferably about two years old or younger, and the antigen compositions are administered at any one or more of the

following times: two weeks, one month, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11 months, or one year or 15, 18, or 21 months after birth, or at 2, 3, 4, or 5 years of age.

In general, administration to any mammal is preferably initiated prior to the first sign of disease symptoms, or at the first sign of possible or actual exposure to *Neisseria*.

5 Where particular immunogenic peptides that give rise to protective immunity are identified as described above and below, these antigens may be directly administered instead of MVs or OMVs. Where the identified antigens are peptides, the DNA encoding one or more of the peptides of the invention can also be administered to the patient. This approach is described, for instance, in Wolff et al., *Science* 247: 1465-1468 (1990), as well as U.S.
10 Patents Nos. 5,580,859 and 5,589,466.

3. Detection of immunogenic antigens

Subcellular fractions such as MVs and OMVs contain many antigens that may give rise to an immune response (see, e.g., Figure 2 which depicts an electrophoretic gel of several such fractions). However, not every antigen in a preparation may elicit either a
15 humoral response or protective immunity against a disease caused by a *Neisseria meningitidis* spp. Thus, the present invention also relates to individual antigens and/or combinations of antigens that induce protective immunity. Another objective is to use the identified antigens to formulate antigen compositions that may be used to elicit protective immunity against a *Neisserial* disease.

20 Antisera or mAbs are obtained or produced from mammals that are induced by the methods of the present invention to exhibit protective immunity against a disease caused by a *Neisseria meningitidis* spp.. The antisera or mAbs are used to detect their corresponding *Neisserial* antigens, and the these antigens identified and isolated based on their physicochemical properties (class of molecule: peptide, nucleic acid, etc.; molecular mass,
25 charge, chemical composition, etc.) or amino acid sequence. The isolated antigens (or immunologically effective portions thereof) can then be administered to mammals, singly and/or in combination, as described above, or as recombinant proteins (or immunologically effective fragments thereof) to assess the extent to which they induce protective immunity. The present invention specifically contemplates serially administering antigens isolated from
30 one strain or different strains of *Neisseria*, or administering such antigens in a mixture comprising one or more, usually two or more, more usually three or more, still more usually four to six or more antigens.

Exemplary *Neisserial* antigens suitable for administration as described may include, but are not necessarily limited to those proteins immunoprecipitated with anti-sera produced following vaccination with the CHORI vaccine, particularly those proteins having apparent molecular masses of about 80 kDa, about 59.5 kDa, about 40.7 kDa, about 39.6 kDa, about 33 kDa, about 27.9 kDa, and 14.5 kDa, or antigenic fragments thereof. The antigens administered may include at least one of these antigens, or may include a combination of these antigens (e.g., at least two, at least three, at least four, or more).

Further exemplary *Neisserial* antigens suitable for administration as described may include, but are not necessarily limited to those proteins detected by Western blot with anti-sera produced following vaccination with the CHORI vaccine, particularly those proteins having apparent molecular masses of about 53 kDa-57 kDa; about 46-47 kDa, about 33 kDa, about 20 kDa to 21 kDa; and about 18 kDa, or antigenic fragments thereof. The antigens administered may include at least one of these antigens, or may include a combination of these antigens (e.g., at least two, at least three, at least four, or more).

It should be noted that references made to molecular masses of proteins refer to apparent molecular mass as determined using SDS-PAGE under the conditions described. It will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan upon reading the present specification that these apparent molecular masses may vary for the same protein between two different experiments (e.g., using different gels or different preparations, when isolated from two different strains (e.g., due to polymorphisms between strains due to amino acid substitutions, deletions, and/or insertions, post-translational modifications, and the like)), and further that different proteins may appear to have the same apparent molecular mass.

Antigens that elicit protective immunity are detected by known methods: for example, immunoassay, immunoprecipitation, affinity chromatography, Western blots, etc. Examples of such methods are described below.

(a) Detection of Antigens by Immunoassay

A variety of immunoassay formats are used to characterize antisera and antibodies specifically immunoreactive with a particular antigen or antigenic composition, and also to measure the strength of an immune response to a particular antigen or antigenic composition. The first step is generally producing antiserum or an antibody preparation that binds to the antigen or antigenic composition.

(1) **Production Of Immune Antisera And Specific Polyclonal Or Monoclonal Antibodies**

Methods of producing polyclonal and monoclonal antibodies used in these assays are known to those of skill in the art. See, e.g., Coligan (1991), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY; and Harlow and Lane (1989), *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.) 1997 *MEDICAL IMMUNOLOGY* 9th ed. McGraw-Hill Professional Publishing, New York, NY, and references cited therein; Goding (1986), *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (2d ed.) Academic Press, New York, NY; and Kohler and Milstein (1975), *Nature*, 256: 495-497. For example, in order to produce antisera for use in an immunoassay, a composition that contains antigens from *Neisseria meningitidis* spp. is given alone or mixed with an adjuvant and injected into an animal of choice (e.g. a mouse, rat, rabbit, pig, goat, cow, horse, chicken, etc.) according to any of the protocols described herein.

The animal's immune response to the immunogen preparation is monitored by taking test bleeds and determining the titer of reactivity of serially diluted aliquots of serum to serially diluted aliquots of the antigenic composition. Polyclonal antisera with a titer of 10^4 or greater are selected and tested for their cross reactivity against non-immunogenic controls, using a competitive binding immunoassay. Specific monoclonal and polyclonal antibodies and antisera will usually bind with a dissociation constant (K_D) of at least about 0.1 mM, more usually at least about 1 μ M, preferably at least about 0.1 μ M or better, and most preferably, .01 μ M or better.

(2) **Monoclonal Antibodies**

In some instances, it is desirable to prepare monoclonal antibodies from various mammalian hosts, such as mice, rodents, primates, humans, etc. Description of techniques for preparing such monoclonal antibodies are found in, e.g., Stites et al. *Supra*, and references cited therein; Harlow and Lane, *Supra*; Goding *Supra*; and Kohler and Milstein. *Supra*. Summarized briefly, this method proceeds by injecting an animal with an immunogenic preparation. The animal is then sacrificed and cells taken from its spleen, which are fused with myeloma cells. The result is a hybrid cell or "hybridoma" that is capable of reproducing *in vitro*. The population of hybridomas is then screened to isolate individual clones, each of which secrete a single antibody species to the immunogen. In this manner, the individual antibody species obtained are the products of immortalized and

cloned single B cells from the immune animal generated in response to a specific site recognized on the immunogenic substance.

Alternative methods of immortalization include transformation with Epstein Barr Virus, oncogenes, or retroviruses, or other methods known in the art. Colonies arising from single immortalized cells are screened for production of antibodies of the desired specificity and affinity for the antigen, and yield of the monoclonal antibodies produced by such cells is enhanced by various techniques, including injection into the peritoneal cavity of a vertebrate (preferably mammalian) host.

Other suitable techniques involve selection of libraries of recombinant antibodies in phage or similar vectors (see, e.g., Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275-1281; Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544-546; and Vaughan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 309-314).

(3) Immunoassays

Once an immune serum or a monoclonal antibody that recognizes one or more *Neisserial* antigens is obtained, it may be used to perform immunoassays. For a review of immunological and immunoassay procedures in general, see D. Stites and A. Terr, (eds.), *Supra*. Moreover, the immunoassays of the present invention can be performed in any of several configurations, which are reviewed extensively in ENZYME IMMUNOASSAY, E.T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1980); "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," P. Tijssen, in LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam (1985); and Harlow and Lane, *supra*, each of which is incorporated herein by reference.

For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select monoclonal antibodies specifically immunoreactive with an antigen. See Harlow and Lane, *Supra*.

Immunoabsorbed and/or pooled antisera (or monoclonal antibodies) are also used in a direct or competitive binding immunoassay. The latter compares the binding of a second antigen composition (e.g. MVs, OMVs, isolated antigens or antigen compositions from an unknown or a known different *Neisserial* strain) to that of the reference antigen composition used to elicit protective immunity. In order to make this comparison in the competitive assay, the two antigen preparations are each assayed at a wide range of concentrations and the amount of each molecule required to inhibit 50% of the binding of the antisera to the immobilized reference antigen preparation is determined. If the amount of the second protein required is less than 10 times the amount of the reference peptide used to make the

antibody, then the second protein is said to specifically bind to an antibody generated to the reference antigen preparation.

(b) Western Blots

Western blot analysis generally comprises separating sample products by gel electrophoresis on the basis of molecular weight, transferring the separated proteins to a suitable solid support (such as a nitrocellulose filter, a nylon filter, or derivatized nylon filter), and incubating the sample with labeling antibodies that specifically bind to the analyte protein. The labeling antibodies specifically bind to analyte on the solid support. These antibodies are directly labeled, or alternatively are subsequently detected using labeling agents such as antibodies (e.g. labeled sheep anti-mouse antibodies where the antibody to an analyte is a murine antibody) that specifically bind to the labeling antibody.

4. Purification of Immunogenic Antigens

The antigens can be isolated (separated from one or more molecules with which the antigen is associated *in vivo*) and purified (a purified antigen, e.g. a protein, preferably exhibits essentially a single band on an electrophoretic gel for each dissociable subunit of the antigen) and used to elicit protective immunity.

Individual antigens, especially proteins and peptide fragments thereof, can be purified by any of a variety of known techniques, including, for example, reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC), ion-exchange or immunoaffinity chromatography, separation by size, or electrophoresis (see, generally, Scopes, R. *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). For example, antigens from *Neisseria meningitidis* spp. that are recognized by broad spectrum antisera obtained after serial injections of OMVs and/or MVs obtained from different *Neisseria meningitidis* spp. are obtained by using broad spectrum antisera to generate enriched antigen preparations. Isolated antigens may also be prepared by immunoprecipitating a fraction obtained from *Neisseria meningitidis* spp. The antigens may also be isolated by conjugating immune antisera or monoclonal antibodies to a column and performing affinity chromatography. The source of the antigens may be a whole cell lysate obtained by known methods, for example by sonication, or alternatively by exposure to an ionic or nonionic detergent, or the source may be MVs or OMVs from a *Neisserial* strain.

5. Peptide Antigens

Furthermore, once the identity of protein antigens and/or specific peptide epitopes is established, antigen preparations from *Neisseria meningitidis* spp. suitable for inducing

protective immunity in the present invention can be generated by synthesizing peptides by conventional techniques, and injecting synthetic peptide preparations into a mammal. Techniques for peptide synthesis are well known in the art. See, e.g., Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Rockford, Ill., Pierce), 2d Ed. (1984) and Kent, 1988, *Annu. Rev. Biochem.* 57:957.

Alternatively, nucleic acid sequences which encode the particular polypeptide may be cloned and expressed to provide the peptide. Standard techniques can be used to obtain and screen nucleic acid libraries to identify sequences encoding the desired sequences (see Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989), or nucleic acids that encode desired peptides may be synthesized by known methods. Fusion proteins (those consisting of all or part of the amino acid sequences of two or more proteins) can be recombinantly produced. In addition, using *in vitro* mutagenesis techniques, unrelated proteins can be mutated to comprise the appropriate sequences.

It will be understood that the immunogenic antigens of the present invention may be modified to provide a variety of desired attributes, e.g. improved pharmacological characteristics, while increasing or at least retaining substantially all of the biological activity of the unmodified peptide. For instance, the peptides can be modified by extending, decreasing the amino acid sequence of the peptide. Substitutions with different amino acids or amino acid mimetics can also be made.

The peptides employed in the subject invention need not be identical to those disclosed in the Examples section below (e.g., with respect to molecular weight), so long as the subject peptides are able to induce an immune response against the desired antigen molecule. Thus, one of skill will recognize that a number of conservative substitutions (described in more detail below) can be made without substantially affecting the activity of the peptide.

Single amino acid substitutions, deletions, or insertions can be used to determine which residues are relatively insensitive to modification. Substitutions are preferably made with small, relatively neutral moieties such as Ala, Gly, Pro, or similar residues. The effect of single amino acid substitutions may also be probed using D-amino acids. The numbers and types of residues which are substituted or added depend on the spacing necessary between essential contact points and certain functional attributes which are sought (e.g. hydrophobicity versus hydrophilicity). Increased immunogenicity may also be achieved by

such substitutions, compared to the parent peptide. In any event, such substitutions should employ amino acid residues or other molecular fragments chosen to avoid, for example, steric and charge interference which might disrupt binding.

The substituting amino acids, however, need not be limited to those naturally occurring in proteins, such as L- α -amino acids, or their D-isomers. The peptides may be substituted with a variety of moieties such as amino acid mimetics well known to those of skill in the art. (See, e.g., U.S. Pat. No. 6,030,619)

The individual residues of the immunogenic antigenic polypeptides can be incorporated in the peptide by a peptide bond or peptide bond mimetic. A peptide bond mimetic of the invention includes peptide backbone modifications well known to those skilled in the art. Such modifications include modifications of the amide nitrogen, the α -carbon, amide carbonyl, complete replacement of the amide bond, extensions, deletions or backbone crosslinks. See, generally, Spatola, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. VII (Weinstein ed., 1983). Several peptide backbone modifications are known. These include ψ [CH₂S], Ψ [CH₂NH], Ψ [CSNH₂], Ψ [NHCO], Ψ [COCH₂] and Ψ [(E) or (Z) CH=CH]. The nomenclature used above follows that suggested by Spatola, above. In this context, Ψ indicates the absence of an amide bond. The structure that replaces the amide group is specified within the brackets.

Amino acid mimetics may also be incorporated in the peptides. An "amino acid mimetic" as used here is a moiety other than a naturally occurring amino acid that conformationally and functionally serves as a substitute for an amino acid in a polypeptide of the present invention. Such a moiety serves as a substitute for an amino acid residue if it does not interfere with the ability of the peptide to illicit an immune response against the appropriate antigen. Amino acid mimetics may include non-protein amino acids, such as β - γ - δ -amino acids, β - γ - δ -imino acids (such as piperidine-4-carboxylic acid), as well as many derivatives of L- α -amino acids. A number of suitable amino acid mimetics are known to the skilled artisan; they include cyclohexylalanine, 3-cyclohexylpropionic acid, L-adamantyl alanine, adamantylacetic acid and the like. Peptide mimetics suitable for peptides of the present invention are discussed by Morgan and Gainor, (1989) *Ann. Repts. Med. Chem.* 24: 243-2526.

As noted above, the peptides employed in the subject invention need not be identical, but may be substantially identical, to the corresponding sequence of the target antigen. Therefore, the peptides may be subject to various changes, such as insertions, deletions, and

substitutions, either conservative or non-conservative, where such changes might provide for certain advantages in their use. The polypeptides of the invention can be modified in a number of ways so long as they comprise a sequence substantially identical (as defined below) to a sequence in the target region of the antigen.

5 Alignment and comparison of relatively short amino acid sequences (less than about 30 residues) is typically straightforward. Comparison of longer sequences may require more sophisticated methods to achieve optimal alignment of two sequences. Optimal alignment of sequences for aligning a comparison window may be conducted by the local homology
10 algorithm of Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482, by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, by the search for similarity method of Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by inspection, and the best alignment (i.e.
15 resulting in the highest percentage of sequence similarity over the comparison window) generated by the various methods is selected.

The terms "identical" or percent "identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same,
20 when compared and aligned for maximum correspondence, as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by visual inspection.

The phrase "substantially identical," in the context of two nucleic acids or polypeptides, refers to two or more sequences or subsequences that have at least 60%, preferably 80%, most preferably 90-95% nucleotide or amino acid residue identity, when
25 compared and aligned for maximum correspondence, as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by visual inspection. Preferably, the substantial identity exists over a region of the sequences that is at least about 50 residues in length, more preferably over a region of at least about 100 residues, and most preferably the sequences are substantially identical over at least about 150 residues. In a most preferred embodiment, the
30 sequences are substantially identical over the entire length of the coding regions.

For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequence coordinates are designated, if

necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters.

Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, e.g., by the local
 5 homology algorithm of Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), by the
 homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by
 the search for similarity method of Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444
 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BRSTTTT, FASTA,
 and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575
 10 Science Dr., Madison, WI), or by visual inspection (see generally, *Current Protocols in*
Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between
 Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement)
 (Ausubel)).

Examples of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity
 15 and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in
 Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 and Altschuel et al. (1977) *Nucleic Acids*
Res. 25: 3389-3402, respectively. Software for performing BLAST analyses is publicly
 available through the National Center for Biotechnology Information
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). This algorithm involves first identifying high scoring
 20 sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which
 either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of
 the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score
 threshold (Altschul et al, *supra*).

These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer
 25 HSPs containing them. The word hits are then extended in both directions along each
 sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores
 are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of
 matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0).
 For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score.
 30 Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score
 falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to
 zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments;
 or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T, and X

determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=4, and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength (W) of 3, an expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

In addition to calculating percent sequence identity, the BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, e.g., Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

A further indication that two nucleic acid sequences or polypeptides are substantially identical is that the polypeptide encoded by the first nucleic acid is immunologically cross reactive with the polypeptide encoded by the second nucleic acid, as described below. Thus, a polypeptide is typically substantially identical to a second polypeptide, for example, where the two peptides differ only by conservative substitutions. Another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the two molecules hybridize to each other under stringent conditions, as described below.

Preferably, residue positions which are not identical differ by conservative amino acid substitutions. Conservative amino acid substitutions refer to the interchangeability of residues having similar side chains. For example, a group of amino acids having aliphatic side chains is glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine; a group of amino acids having aliphatic-hydroxyl side chains is serine and threonine; a group of amino acids having amide-containing side chains is asparagine and glutamine; a group of amino acids having aromatic side chains is phenylalanine, tyrosine, and tryptophan; a group of amino acids having basic side chains is lysine, arginine, and histidine; and a group of amino acids having sulfur-containing side chains is cysteine and methionine. Preferred conservative amino acids substitution groups are: valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, and asparagine-glutamine.

Polypeptides encompassed by the invention typically comprise at least about 10 residues and more preferably at least about 15 residues, preferably from a domain of the antigen that is exposed to the immune system. In certain embodiments the peptides will not exceed about 50 residues and typically will not exceed about 30 residues.

5 The immunogenic peptides are conformationally constrained. Means for achieving this are well known in the art (see, e.g., Hruby and Bonner in *Methods in Molecular Biology, Volume 35: Peptide Synthesis Protocols*, Pennington and Dunn eds (Humana Press, Totowa, NJ, 1994). A preferred means for preparing conformationally constrained peptides is through cyclization. Any method commonly used to produce cyclized oligopeptides can be
10 used to produce the peptides of the invention. For example, in certain embodiments the peptides will include cysteine residues at both termini, which allow the production of cyclic peptides through disulfide linkages. Treatment of such a peptide with an oxidizing agent such as oxygen, iodine or similar agent will produce a cyclic peptide which may be further purified using chromatographic or other methods of chemical purification. Construction of
15 cyclic peptides can also be accomplished through thioether linkages. For instance, N-bromoacetyl-derivatized peptides can be reacted with sulfhydryl-containing residues, such as cysteine. Cyclization occurs by reaction of the free sulfhydryl of cysteine in the peptide with the bromoacetyl group to form a thioether linkage (Robey et al., *Anal. Biochem.* 177: 373-7 (1989) and U.S. Patent No. 5,066,716).

20 Other methods of constructing cyclic peptides are known to those skilled in the art. These include side chain-side chain, side chain-main chain and main chain-main chain cyclizations. In addition, linkers can be used to join the amino and carboxyl termini of a peptide. The linker is capable of forming covalent bonds to both the amino and carboxyl terminus. Suitable linkers are well known to those of skill in the art and include, but are not
25 limited to, straight or branched-chain carbon linkers, heterocyclic carbon linkers, or peptide linkers. The linkers may be joined to the carboxyl and amino terminal amino acids through their side groups (e.g. through a disulfide linkage to cysteine) or through the alpha carbon amino and carboxyl groups of the terminal amino acids.

For a general discussion of suitable methods for cyclization, see Hruby and Bonner
30 in *Methods in Molecular Biology, Volume 35: Peptide Synthesis Protocols*, Pennington and Dunn eds (Humana Press, Totowa, NJ, 1994). For instance, cyclizations may include formation of carba analogs and thioethers (Lebl et al. in *Peptides 1986 Proceedings of the 19th European Peptide Symposium* pp. 341-344; Robey et al., *Anal. Biochem.* 177: 373-7

(1989) and U.S. Patent No. 5,066,716), bis-thioethers (Mosberg et al. *JACS* 107: 2986-2987 (1985)), azopeptides (Siemion et al. *Mol. Cell. Biochem.* 34: (1991)), and other cyclic structures, such as bridging structures (Charpentier, M., et al., *J. Med. Chem.* 32(6): 1184-1190 (1989), Thaisrivonga, S., et al., *J. Med. Chem.* 34(4):127 (1991) and Ozeki, E., et al.,
5 *Int. J. Peptide Protein Res.* 34:111 (1989)). Cyclization from backbone-to-backbone positions may also be used.

Bridging is a special type of cyclization in which distant sites in a peptide are brought together using separate bridging molecules or fragments. Bridging molecules may include, for example, succinic anhydride molecules (Charpentier, B., et al., *supra*), and
10 carboxymethylene fragments (Thaisrivongs, S., et al., *supra*). Bridging by metals can also be used (Ozeki, E., et al., *supra*).

In some embodiments, the peptides include two or more cystine residues. The cystines can be substituted or added within the peptide or at either terminus. The position of the cystines is not critical so long as disulfide linkages can form between them which allow
15 the production of cyclic peptides. For example, treatment of such a peptide with an oxidizing agent such as oxygen, iodine or similar agent will produce a cyclic peptide which may be further purified using chromatographic or other methods of chemical purification.

Additional embodiments include peptides containing antigenic sequences of protein sequences that have been incorporated into independently folding peptides (Regan &
20 DeGrado, 1988, *Science* 241:976; Mutter, 1988, *TIBS* 13:260; Kamtekar et al., 1993, *Science* 262:1680; Sieber & Moe, 1996, *Biochemistry* 35:181; Butcher & Moe, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1135; FitzGerald et al., 1998, *Biochemistry* 273:9951). The independently folding peptides may be naturally occurring or of de novo design.

Peptides capable of eliciting protective immunity similar to that of the CHORI
25 vaccine might also be obtained by using monoclonal antibodies produced by immunization with CHORI antigen or the like to select molecular mimetics from phage display peptide libraries or other combinatorial libraries such as small molecules or nucleic acids.

In addition to use of peptides, antibodies raised against peptides of the invention can be used to inhibit inflammatory responses. Antibodies can be raised to the peptides of the
30 present invention using techniques well known to those of skill in the art. Anti-idiotypic antibodies can also be generated. The following discussion is presented as a general overview of the techniques available; however, one of skill will recognize that many variations upon the following methods are known.

42

Frequently, the peptides and antibodies of the invention will be labeled by joining, either covalently or non-covalently, a substance which provides for a detectable signal. A wide variety of labels and conjugation techniques are known and are reported extensively in both the scientific and patent literature. Suitable labels include radionucleotides, enzymes, substrates, cofactors, inhibitors, fluorescent moieties, chemiluminescent moieties, magnetic particles, and the like. Patents teaching the use of such labels include U.S. Patents Nos. 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 and 4,366,241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced. See Cabilly, U.S. Patent No. 4,816,567; and Queen et al. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033.

6. Passive immunity

Immunoprotective antibodies that recognize *Neisserial* epitopes can also be administered to an organism (e.g. a human patient) to induce passive immunity against a *Neisserial* disease, either to prevent infection or disease from occurring, or as a therapy to improve the clinical outcome in patients with established disease (e.g. decreased complication rate such as shock, decreased mortality rate, or decreased morbidity, such as deafness).

Antibodies administered to an organism other than the species in which they are raised are often immunogenic. Thus, for example, murine or porcine antibodies administered to a human often induce an immunologic response against the antibody. The immunogenic properties of the antibody are reduced by altering portions, or all, of the antibody into characteristically human sequences thereby producing chimeric or human antibodies, respectively.

Chimeric antibodies are immunoglobulin molecules comprising a human and non-human portion. More specifically, the antigen combining region (or variable region) of a humanized chimeric antibody is derived from a non-human source (e.g. murine), and the constant region of the chimeric antibody (which confers biological effector function to the immunoglobulin) is derived from a human source. The chimeric antibody should have the antigen binding specificity of the non-human antibody molecule and the effector function conferred by the human antibody molecule. A large number of methods of generating chimeric antibodies are well known to those of skill in the art (see, e.g., U.S. Patents Nos. 5,502,167, 5,500,362, 5,491,088, 5,482,856, 5,472,693, 5,354,847, 5,292,867, 5,231,026, 5,204,244, 5,202,238, 5,169,939, 5,081,235, 5,075,431 and 4,975,369). An alternative approach is the generation of humanized antibodies by linking the CDR regions of non-

human antibodies to human constant regions by recombinant DNA techniques. See Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989) and WO 90/07861.

In one preferred embodiment, recombinant DNA vector is used to transfect a cell line that produces an antibody against a peptide of the invention. The novel recombinant DNA vector contains a "replacement gene" to replace all or a portion of the gene encoding the immunoglobulin constant region in the cell line (e.g. a replacement gene may encode all or a portion of a constant region of a human immunoglobulin, or a specific immunoglobulin class), and a "target sequence" which allows for targeted homologous recombination with immunoglobulin sequences within the antibody producing cell.

In another embodiment, a recombinant DNA vector is used to transfect a cell line that produces an antibody having a desired effector function (e.g. a constant region of a human immunoglobulin), in which case, the replacement gene contained in the recombinant vector may encode all or a portion of a region of an antibody and the target sequence contained in the recombinant vector allows for homologous recombination and targeted gene modification within the antibody producing cell. In either embodiment, when only a portion of the variable or constant region is replaced, the resulting chimeric antibody may define the same antigen and/or have the same effector function yet be altered or improved so that the chimeric antibody may demonstrate a greater antigen specificity, greater affinity binding constant, increased effector function, or increased secretion and production by the transfected antibody producing cell line, etc.

In another embodiment, this invention provides for fully human antibodies. Human antibodies consist entirely of characteristically human polypeptide sequences. The human antibodies of this invention can be produced by a wide variety of methods (see, e.g., Larrick et al., U.S. Patent No. 5,001,065). In one embodiment, the human antibodies of the present invention are produced initially in trioma cells (descended from three cells, two human and one mouse). Genes encoding the antibodies are then cloned and expressed in other cells, particularly non-human mammalian cells. The general approach for producing human antibodies by trioma technology has been described by Ostberg et al. (1983), *Hybridoma* 2: 361-367, Ostberg, U.S. Patent No. 4,634,664, and Engelman et al., U.S. Patent No. 4,634,666. Triomas have been found to produce antibody more stably than ordinary hybridomas made from human cells.

Methods for producing and formulation antibodies suitable for administration to a subject (e.g., a human subject) are well known in the art. For example, antibodies can be

provided in a pharmaceutical composition comprising an effective amount of an antibody and a pharmaceutical excipients (e.g., saline). The pharmaceutical composition may optionally include other additives (e.g., buffers, stabilizers, preservatives, and the like). An effective amount of antibody is generally an amount effective to provide for protection
5 against *Neisserial* disease or symptoms for a desired period, e.g., a period of at least about 2 days to 10 days or 1 month to 2 months).

7. Diagnostic assays

The antigens or antibodies of the invention can also be used for diagnostic purposes. For instance, peptides can be used to screen pre-immune and immune sera to ensure that the
10 vaccination has been effective. Antibodies can also be used in immunoassays to detect the presence of particular antigen molecules associated with *Neisserial* disease.

EXAMPLES

It is understood that the examples and embodiments described herein are for
15 illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

20 A. Membrane preparations

Strains for preparation of OMVS and MVs were selected on the basis of sergroup, serotype, and serosubtype. Strains to be used in the preparation of MVs were selected for relatively high levels of blebbing and expression of NspA (see Moe et al. (1999 Infect. Immun. 67: 5664). Exemplary strains used in preparation of OMVs and MVs have been
25 deposited with the American Type Culture Collection (ATCC; see below). Strains that produce high levels of blebs, which strains are particularly useful in the MV production, can be selected or are known in the art (see, e.g., WO 01/34642).

The meningococcal strain frozen at -80°C in aqueous -2% skim milk (w/v) was subcultured on a commercial chocolate agar plate (Remel, Lantana, KS). After overnight
30 growth at 37°C in 4% CO₂, several colonies were selected to inoculate ~7 ml of sterile Mueller-Hinton broth to an OD_{620nm} of 0.1. The culture was incubated at 37°C, 4% CO₂ with rocking until the OD_{620nm} reaches 0.6-0.8 (two to three hours). Two to three 7 ml starter cultures were then used to inoculate 500 ml of Mueller-Hinton broth. The larger

culture was grown to an OD_{620nm} of 0.9-1.0 at 37°C with vigorous shaking. Phenol is added to the culture to a final concentration of 0.5% (w/v) and the mixture is left at 4°C overnight to inactivate the bacteria. The cells were then pelleted by centrifugation (11,000 x g) for 30 min. at 4°C. The cell pellets were frozen at -20°C until used for preparation of outer
5 membrane protein vesicles (OMV).

Microvesicles (MV) were harvested from the phenol-treated cell culture supernatant by adding solid ammonium sulfate (390 g/l final concentration) slowly with stirring. After the ammonium sulfate was added and completely dissolved, the mixture was left at 4°C overnight. The precipitated MVs were then collected by centrifugation at 11,000 x g for 30
10 min. The precipitated MV pellet was resuspended in 0.04 volume of PBS and centrifuged again at 16,000 x g for 15 min. at 4°C. The pellet was discarded and the MVs, which remain in the supernatant, were collected by centrifugation at 100,000 x g for 2 hrs. at 4°C. The final pellet was resuspended in 0.01 volume (i.e. 5 ml per 500 ml of culture) of water ("MV" vaccine preparation). Alternatively, the pellet was resuspended in 0.1M Tris-HCl, pH 8.6,
15 containing 10 mM EDTA and 0.5% (w/v) sodium deoxycholate (~3 ml/500 ml cell culture). After stirring (30 min), the mixture was centrifuged (125,000 x g, 2 hrs, 4°C). The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 ml of 3% sucrose ("DOC MV" vaccine preparation). The protein concentration of the MV and DOC MV preparations was determined by BCA assay (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). The MV and DOC MV
20 suspensions were then frozen on dry ice and stored at -20°C until used for immunization.

Outer membrane vesicles (OMV) were prepared by the method of Zollinger et al. (1979 *J. Clin. Invest.* 63: 836-848). The frozen cell pellet was resuspended in 10 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 containing 0.15 M NaCl and 0.01 M EDTA then heated to 56°C for 30 min. followed by cooling on ice. The cell suspension was then sonicated on ice with
25 several 15-second bursts using a microprobe sonifier (Branson, Danbury, CT). Cell debris was removed by centrifugation at 16,000 x g for 15 min., and the outer membrane vesicles (OMVs) in the supernatant were obtained by ultracentrifugation at 100,000 x g for 2 hrs. at 4°C. The OMV pellet was resuspended in 2 ml of water ("OMV" vaccine preparation). Alternatively, the frozen cell pellet was resuspended in 0.1M Tris-HCl, pH 8.6, containing
30 10 mM EDTA and 0.5% (w/v) sodium deoxycholate.. After stirring for 30 min. at ambient temperature, the mixture was centrifuged (20,000 x g, 30 min., 4°C). The supernatant was retained and the pellet was reextracted and centrifuged again with one third volume of the same buffer. The supernatants from both extractions were combined and centrifuged

(125,000 x g, 2 hrs, 4°C). The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 5 ml of 3% sucrose ("DOC OMV" vaccine preparation). The OMV and DOC OMV vaccine preparations were frozen on dry ice, and stored at -20°C until used for immunization. The protein concentration of the OMV and DOC OMV preparations was determined by BCA

5 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

B. Immunization schedule

MV or OMV preparations were diluted in PBS and either mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) or aluminum hydroxide (Alhydrogel 1.3% from Superfos Biosector, Frederikssund, Denmark),
10 or aluminum phosphate (Alhydrogel that had been incubated with PBS buffer for at least 3 hrs). In some vaccine preparations, CpG nucleotides (5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3' (SEQ ID NO:1) Chiron Corp., Emeryville, CA) were added to the aluminum phosphate/antigen mixture to a final concentration of 100 µg/ml as a second adjuvant. Mice were immunized by the IP (CFA) or SC (aluminum phosphate, aluminum hydroxide) routes
15 with 100 µl containing between 5 to 25 micrograms of total protein of the MV prepared from the meningococcal strain RM1090. At 3- to 4-week intervals two subsequent booster doses (5-25 micrograms /mouse) were given with either incomplete Freund's adjuvant (IFA), or aluminum hydroxide, or aluminum phosphate (prepared as described above) by the IP or SC routes, respectively, of first MVs prepared from meningococcal strain BZ198 and then
20 OMVs prepared from meningococcal strain Z1092. The sequential immunization with three different meningococcal strains, which were genetically different with respect to their serogroup, serotype, and serosubtype and other antigens constitutes what is hereafter designated "CHORI vaccine". In a second experiment, another group of mice were immunized with CHORI vaccine as described above except that CpG oligonucleotides were
25 not used as a second adjuvant and the experiment included mice that were given the CHORI vaccine combined with aluminum hydroxide adjuvant and mice that were given three injections of a mixture of the MV/OMV described above together with aluminum phosphate. In a third experiment, groups of guinea pigs were given either sequential immunizations with CHORI vaccine antigens or three injections of a mixture of CHORI vaccine antigens
30 combined with aluminum phosphate.

C. SDS-PAGE and Western blots

Protein preparations were analyzed using 15% SDS-PAGE as described by Laemmli (1970 *Nature* 227: 680-685) employing a Mini-Protean II electrophoresis apparatus (Bio-

Rad, Richmond, CA). Samples were suspended in SDS sample buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10 micrograms/ml bromophenol blue) and optionally heated to 100°C for 1 min. before loading directly onto the gel.

Figure 2 shows a Coomassie-stained 15% SDS-PAGE gel of the proteins present in the MV of strain Z1092 (lane 2) or OMV preparations from strain Z1092 (lane 4), or the respective preparations after having been extracted with 0.5% (w/v) sodium deoxycholate (i.e. DOC MV [lane 3] and DOC OMV [lane 5]) as described by Fredricksen et al. (1991, *NIPH Ann.* 14: 67-79). The four corresponding preparations made from meningococcal strains BZ198 and RM1090 (are shown in lanes 6 to 13, respectively). Five proteins, PorA, PorB, Rmp, Opa, and Opc, are known to constitute the major outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. All of the preparations appear to contain the major outer membrane proteins PorA and PorB (~39-42 kDa) and the opacity proteins, Opa and Opc (~28-31 kDa), although the apparent mass of the particular proteins and relative amounts were different in each preparation. The less distinct protein having an apparent mass of ~31-34 kDa in the DOC OMV preparations may be reduction modifiable protein (Rmp). In addition to these major outer membrane proteins, each MV and OMV preparation contains various other proteins in lesser amounts. In general, the minor proteins are more variable between strains and between MV compared to OMV preparations.

D. Antibody binding to the cell surface

Binding of antibodies to the surface of live bacteria was determined by indirect fluorescence flow cytometry (Granoff et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 5028-5036). Bacterial cells were grown to mid-log phase in Mueller-Hinton broth, harvested by centrifugation, and resuspended in blocking buffer (PBS containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 0.4% (w/v) sodium azide) at a density of $\sim 10^8$ cells per ml. Dilutions of test or control antiserum (typically 1:20, 1:200, 1:2000) were then added and allowed to bind to the cells, which were maintained on ice for 2 hrs. Following two washes with blocking buffer, the cells were incubated with FITC-conjugated F(ab')₂ fragment goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson Immune Research, West Grove, PA) for 1 hr. The cells were washed twice with blocking buffer then reacted with 0.25% formaldehyde in PBS buffer before analyzing the bacterial cells by flow cytometry.

Positive control antibodies included meningococcal-specific serotyping or serosubtyping monoclonal antibodies (MN2C3B, MN16C13F4, Rijksinstituut Voor

Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, The Netherlands) and SEAM 12, an anti-polysaccharide monoclonal antibody that is specific for encapsulated serogroup B strains (Granoff et al., 1998, *J. Immunol.* 160:5028). The negative control consisted of a mouse IgG monoclonal antibody (VIG10) of irrelevant specificity and polyclonal sera from mice immunized with membrane proteins from *E. coli*. Antibodies used to define serogroup, serotype, and serosubtype are provided in Figures 20 and 21.

Figure 3 shows the results of a typical experiment examining antibody binding to two test strains: MC58 and S3446. Both strains express PorA and PorB proteins that are heterologous with the respective porin proteins from the three strains used to prepare the CHORI vaccine. The antisera from mice immunized with CHORI antigen show an increase in fluorescence intensity with both strains when the antisera were tested at dilutions of 1:20 to 1:200. In contrast, polyclonal antisera prepared to proteins precipitated from culture supernatant of the *E. coli* show only low intensity background fluorescence (1:20 dilution), and were considered negative. Antisera from guinea pigs immunized with the Norwegian vaccine, prepared from OMV from strain H44/76 (P1.7,16), was positive against strain MC58 with an homologous PorA serosubtype (P1.7,16) but was negative when tested at 1:20 dilution against strain S3446 with a heterologous serosubtype (P1.22,14).

As summarized in Figure 4, of the 12 *N. meningitidis* serogroup B strains tested by flow cytometry, 11 (92%), including 6 strains with heterologous PorA serosubtypes, and 3 strains having both heterologous serotypes and serosubtypes, were positive for cell surface binding by anti-CHORI antigen antisera. The one negative strain does not express PorA, which suggests that some of the anti-CHORI vaccine antibodies bind to PorA or to proteins whose expression may be regulated in conjunction with PorA expression. In addition to the 11 meningococcal B strains, the anti-CHORI vaccine antisera was positive also in this assay when tested with heterologous meningococcal serogroup A (Z1073) and C (60E) strains (Figure 5).

E. Complement-dependent bactericidal antibody activity

The bactericidal assay was adapted from the method previously described by Mandrell et al. (1995 *J. Infect. Dis.* 172: 1279-1289). Finding that a vaccine produces bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis* is accepted in the field as predictive of the vaccine's protective effect in humans (Goldschneider et al., 1969, *J. Exp. Med.* 129:1307; Borrow et al. 2001 *Infect Immun.* 69:1568). After overnight growth on chocolate agar, several colonies were inoculated into Mueller-Hinton broth (starting A_{630nm} of ~0.1) and the

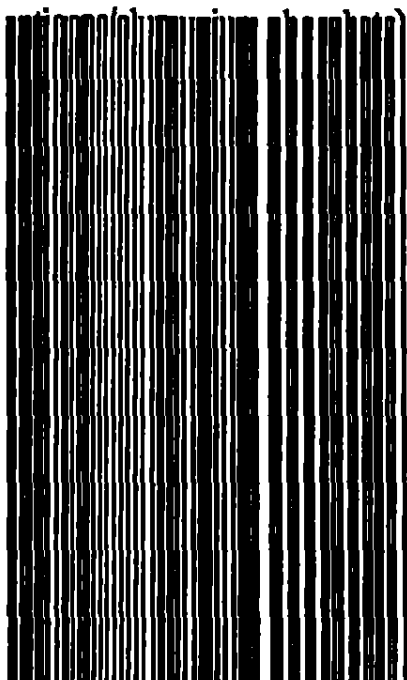
test organism was grown for approximately 2 hrs. to an A_{620nm} of ~0.6. After washing the bacteria twice in Gey's buffer containing 1% BSA (w/v), approximately 300 to 400 colony forming units (CFUs) were added to the reaction mixture. The final reaction mixture of 60 microliters contained 20% (v/v) complement, and serial 2-fold dilutions of test sera or control monoclonal antibodies in Gey's buffer. The complement source was human serum from a healthy adult with no detectable anticapsular antibody to serogroup B polysaccharide when tested by ELISA (Granoff et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 5028-5036), and no detectable intrinsic bactericidal activity against the test strain at a final concentration of 20 or 40%. In preliminary experiments with a panel of test sera, this complement source gave comparable bactericidal titers as those obtained with agammaglobulinemic serum as the complement source. Serum bactericidal titers were defined as the serum dilution (or antibody concentration) resulting in a 50% decrease in CFUs per ml after 60 min. incubation of bacteria in the reaction mixture, compared to the control CFU per ml at time 0. Typically, bacteria incubated with the negative control antibody and complement showed a 150 to 200% increase in CFU/mL during the 60 min. of incubation. Figure 6 shows data from a typical experiment with meningococcal B strain 2996 tested with an anti-meningococcal B capsular mAb (SEAM 12, Granoff et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 5028-5036), mouse and guinea pig control antisera, mouse anti-recombinant NspA and anti-CHORI antigen antisera, and guinea pig anti-Norwegian vaccine antisera.

Figure 7 summarizes the results of measurement of complement-mediated bactericidal activity of the anti-CHORI antigen antisera to each of the meningococcal B strains tested. All 12 strains were killed by complement together with similar concentrations of a positive control anti-capsular mAb (SEAM 12; subtype IgG2a (Granoff et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 5028-5036). Similarly, all 11 strains that were positive for anti-CHORI antisera binding by the flow assay were susceptible to antibody induced complement-mediated bacteriolysis (at a 1:10 dilution or higher, each showed greater than 50% killing, compared to CFU/ml present at time 0). Also, the heterologous meningococcal A and C strains that were positive when tested in the flow assay also were positive in the bactericidal assay (Figure 5). Again, only strain M136, which does not express PorA, and was negative for antibody binding in the flow assay, was resistant to killing in the bactericidal assay. In contrast, antibodies elicited by either the Norwegian vaccine or rNspA, both of which are meningococcal B vaccine candidates currently being tested in humans, were able to activate complement-mediated bacteriolysis with only a limited number of the genetically diverse set

of strains. As with the flow assay, the anti-NspA vaccine antisera and the anti-Norwegian vaccine antisera were bactericidal against only a limited number of the strains.

Figure 8 summarizes the results of testing complement-mediated bactericidal activity of anti-CHORI antisera prepared in a second experiment in mice. Data are shown for antisera prepared with CHORI vaccine given with CFA or aluminum phosphate (without CpG). The results are shown for the 14 meningococcal B strains tested in this experiment (8 with serosubtypes heterologous to those of the vaccine strains). Results also are shown for one additional MenB strain in which the gene encoding NspA has been inactivated (BZ198ΔNspA). All 15 strains were killed by anti-CHORI antisera (14/15 with CHORI vaccine given with CFA; and 13/15 with CHORI vaccine given with aluminum phosphate; for the heterologous strains, 6/7 and 5/7, respectively). In contrast, only 1 of 15 strains was killed by antisera from control animals given 3 injections of *E. coli* MV. These results from a second experiment in mice confirm the earlier results obtained with the CHORI vaccine in experiment 1. In addition, the data indicate that the second adjuvant, CpG oligonucleotides, which was not used in the second experiment, is not needed by the CHORI vaccine to elicit broadly reactive antibody.

A group of mice in the second experiment received three injections, each consisting of a mixture of the same MV, MV and OMV used in the sequential immunization. The resulting antisera were bactericidal against 12 of the 15 strains (4 of 7 of the heterologous strains). Immunization with the mixture of antigens elicited broader bactericidal activity than expected but the titers measured against the some strains tended to be much lower than those obtained in animals given the sequential CHORI vaccine immunization (e.g. strains CU385 and 1000, titers of 1:128 and 1:128 after CHORI vaccine/aluminium phosphate vs. titers of <1:4 and 1:6 in antisera prepared against three injections of the mixed



antibody responses in guinea pigs, a second animal model that may be more predictive of protective antibody responses in humans than mice.

F. Passive animal protection

5 A criticism of bactericidal assays is that it tests the activity of antibodies against bacteria grown in broth, and that bacteria grown in vivo may have different properties. Therefore, the ability of mouse anti-CHORI antiserum to confer passive protection against *N. meningitidis* group B bacteremia was tested in infant rats challenged IP, using an art-accepted model and method adapted from Saukkonen et al. (*J. Infect. Dis.*, 1988, 158: 209-10 212), which is regarded in the field as being predictive of results in humans. The meningococcal B strain 8047, which was positive by the flow cytometric assay for CHORI antigen-surface accessible epitopes and susceptible to anti-CHORI antigen bactericidal activity, was selected for this study. Infant pups (6- to 7-day old) from six litters of outbred Wistar rats (Charles River, Hollister, CA) were randomly redistributed to the nursing 15 mothers. Groups of five to six animals were challenged IP with 100 μ l of approximately 5×10^3 CFU of the group B strain 8047. The strain used had been passaged three times in infant rats. The bacteria isolated from blood cultures after the third pass was grown on chocolate agar overnight and stored frozen at -70°C in vials containing sterile skim milk. On the day of the experiment, the bacteria were grown, washed and resuspended in PBS buffer 20 containing 1% BSA, as described above for the bactericidal assay.

The animals were given antisera or antibodies diluted in PBS containing 1% BSA by IP injection 2 hrs. prior to bacterial challenge. Eighteen hours after the bacterial challenge, blood specimens were obtained by puncturing the heart with a syringe and needle containing one to two drops of 25 Units/ml of heparin without preservative (Fujisawa USA, Deerfield, 25 IL). Aliquots of 1, 10 and 100 microliters of blood were plated onto chocolate agar. The CFU per ml of blood was determined after overnight incubation of the plates at 37°C in 5% CO₂.

Figure 10 summarizes the results of quantitative bacterial cultures performed on blood specimens obtained 18 hrs. after challenge. A dose of 10 micrograms per rat of the 30 positive control anticapsular antibody, SEAM 3, was completely protective against the strain as was mouse anti-CHORI antisera at a dilution of 1:20. In contrast, the guinea pig anti-Norwegian vaccine antisera (1:20) and the two control sera (mouse antisera prepared to -E.

coli proteins or guinea pig antisera from animals immunized with alum alone) were not able to protect against bacteremia caused by strain 8047.

In a second passive protection experiment using the protocol described above, anti-CHORI vaccine antisera prepared in guinea pigs were also shown to protect infant rats from meningococcal B bacteremia after IP challenge (Figure 11). Protection was observed in animals treated with antisera prepared to vaccine administered with aluminum phosphate or aluminum hydroxide, and was superior to the protection observed in control animals treated with 20 µg of a murine anticapsular monoclonal antibody (SEAM 3).

10 G. Immunoprecipitation of surface antigens recognized by anti-CHORI antigen antibodies

The method used for immunoprecipitation of surface-accessible antigens was based on those described by Hansen et al. (1981 *Infect. Immun.* 33: 950-953) and Gulig et al. (1982 *Infect. Immun.* 37: 82-88). In our studies, the method was used with either unlabeled cells, or with cells in which the surface proteins had had been radioiodinated. Cells were grown in Mueller-Hinton broth (~7 ml) to an OD of 0.6 and harvested by centrifugation at 5000 x g at 4°C. The cell pellet was washed two times in cold PBS containing 1% BSA or, for the radioimmunoprecipitation assay, PBS alone.

Cells to be iodinated were transferred to a glass tube. One nanomole of KI and 1 mCi of Na¹²⁵I (Amersham,) were added to the cell suspension. Radioiodination was initiated by the addition of 0.03% H₂O₂ (50 µl) and lactoperoxidase (Sigma, St. Louis, MO) in water (50 µl of a 1 mg/ml solution). The same amounts of H₂O₂ and lactoperoxidase were added at 4 min. intervals for 12 min. The reaction was terminated after 16 min. by adding the reaction mixture to cold PBI (20 ml) (i.e. NaI substituted for NaCl in PBS). The cells were harvested by centrifugation (5,000 x g, 10 min, 4°C), washed 2 times with PBS, then used immediately.

The cells were resuspended in PBS (2 ml) containing 1% BSA. The antisera were added to 0.5 ml aliquots of cell suspension. The mixture was incubated with rocking for 90 min. at 4°C. The cells were then collected by centrifugation (1 min. spin in microfuge), washed two times with PBS/1% BSA, and resuspended in 1 ml of solubilization buffer (50 mM Tris buffer, pH 7.8, containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.2 % sodium deoxycholate, and 0.1 % sodium dodecyl sulfate. After incubation for 60 min. at

37°C, the insoluble material was removed by centrifugation (45,000 x g for 60 min. at 20°C). The supernatants were then transferred to tubes containing 3-4 milligrams of protein A Sepharose beads (Sigma) pre-equilibrated with 50 µl of PBS. The samples were incubated overnight at 4°C with rocking. The beads were washed five times with solubilization buffer.

5 Bound proteins were released from the beads by adding 75 µl of SDS sample buffer and heated to 100°C for 1 min. After removing the supernatant, 1 µl of 2-mercapto ethanol was added to each sample and then heated again to 100°C for 1 min. The samples were then run on a 15% SDS-PAGE gel and stained using silver stain (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

For Western blots, the gel was equilibrated with buffer (48 mM Tris-HCl, 39 mM glycine, pH 9.0, 20% (v/v) methanol) and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using a Trans-Blot™ (Bio-Rad) semi-dry electrophoretic transfer cell. The nitrocellulose membranes were blocked with 2% (w/v) skim milk in PBS containing 0.2% (w/v) sodium azide. Antisera were diluted in the same blocking buffer containing 0.1% Tween-20. Bound antibody was detected using rabbit anti-mouse

10 IgG, A, M-alkaline phosphatase conjugate polyclonal antibody (Zymed, South San Francisco, CA) diluted in PBS containing 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Tween-20, and 0.2% (w/v) sodium azide and Sigma Fast™ BCIP/NBT substrate (Sigma).

Figure 12 is a silver-stained SDS gel demonstrating cell surface proteins precipitated with the anti-CHORI antisera (Lane 2) from M7, a non-encapsulated mutant of serogroup B strain, NMB (Stephens et al. 1991, *Infect. Immun.* 59: 4097-4107). six proteins having

20 apparent masses of 59.5, 40.7, 39.6, 33, 27.9, and 14.5 kDa were precipitated by the antisera prepared to the CHORI antigen (Lane 2) but not by control anti-*E. coli* protein antisera (Lane 3). The same results were obtained when the anti-CHORI antigen antisera were used to precipitate surface proteins from the encapsulated parent strain, NMB (data not shown).

25 Except for the 59.5 and 27.9 kDa heavy and light chain Ig proteins (see below), the same surface proteins detected by silver staining were observed also in ¹²⁵I-labeled cells (data not shown).

Of note, there was no lipooligosaccharide (LOS), which would be detected by silver staining, that was precipitated by the anti-CHORI antigen antisera. Further experiments,

30 described below, were designed to determine whether the observed surface binding and protective biological activity of anti-CHORI vaccine antisera were due to anti-LOS antibodies.

Figure 13 shows a Western blot of the same samples as resolved on the SDS gel in Figure 12. Samples in lanes 1 to 3 were detected by anti-CHORI vaccine antisera. Samples in Lanes 4 to 6 were detected by an anti-PorA P1.2-specific mAb. The proteins having apparent masses of 59.5 and 27.9 kDa in Figure 13, (Lanes 2, 3, 5, and 6) correspond to antibody heavy and light chains, respectively, as they were detected with the rabbit anti-mouse Ig alkaline phosphatase conjugate secondary antibody. The 40.7 kDa protein precipitated by the anti-CHORI antigen antisera (Figure 12, Lane 2) was reactive with the anti-PorA P1.2-specific antibody in the Western (Figure 13, Lane 5) and is, therefore, PorA P1.2. As expected, PorA P1.2 also was detected in the total protein from M7 (Figure 13, Lane 4). The anti-CHORI vaccine antisera detected only the 33 kDa protein (Lane 2) and not PorA. Thus, the antisera prepared to the CHORI antigen reacts with both native and denatured 33 kDa protein but only native forms of the 40.7, 39.6, and 14.5 kDa proteins present on the cell surface of strain M7 (Figure 12, lane 2).

Similar immunoprecipitation experiments were performed on the MV and OMV preparations used for immunization and seven genetically diverse, encapsulated serogroup B strains. The results are summarized in Figure 14. When the results are compared, it is apparent that the sequential immunization with membrane vesicles from three genetically diverse meningococcal strains elicits antibodies that recognize a variety of antigens. Some of the antigens that are recognized are the same in all strains; others are strain specific or common to subsets of strains. For example, proteins having apparent masses of 37-41 kDa were precipitated from strains BZ198 and NMB but not from any of the other strains. Similarly, proteins having an apparent mass of 25.7 kDa were precipitated from strains NG3/88 and S3446 but not from any other strains. However, there is one surface protein having an apparent mass of 32 to 33 kDa that is recognized by anti-CHORI antigen antisera in all of the examples except for strain M136, which was negative in both the flow and bactericidal assays. The 32 to 33 kDa protein may be a conserved antigen.

Additional experiments were performed on encapsulated serogroup B strains. CU385, BZ198 and 1000 using cells in which the surface proteins had had been radioiodinated (Fig. 14A) and precipitated with immune antisera from different groups of mice given the CHORI vaccine. In addition to the proteins described above, in this second set of experiments, proteins with apparent molecular masses between 10 and 14.5 kDa, and 80 kDa were precipitated from strains CU385 and BZ198. Three proteins with apparent kDa of 26, 41 and 45 were precipitated from strain 1000.

It is important to note that not all antigens recognized by the antisera from mice immunized with CHORI antigen were immunoprecipitated from the bacterial cells. There were also antibodies in the antisera to some antigens (e.g. the NspA protein) that were shown to be present by an ELISA or Western blot, but were not immunoprecipitated in this experiment. The failure to detect these other antigens may result from the fact that the antibody/antigen complex must be stable in the presence of detergents (Triton X-100, deoxycholate, and lauryl sulfate) to be detected.

H. Detection of proteins reactive in CHORI vaccine MV and OMV preparations with anti-CHORI vaccine antibodies elicited in mice and guinea pigs.

Figure 15 shows a Western blot of MVs from strains RM1090 (C:2a:P1.5,2:L3,7), and BZ198 (B:NT:P1.4) and OMV from strain Z1092 (A:4:P1.10). Antisera from mice immunized CHORI vaccine combined with CFA, or given with aluminum phosphate adjuvant, or from guinea pigs immunized with CHORI vaccine together with aluminum phosphate adjuvant, were used as the primary detecting antibody. The blot shows that the CHORI vaccine elicits antibodies that are reactive with several proteins having similar apparent molecular mass in each of the MV or OMV preparations independent of the animal species or adjuvant used in the vaccine. The apparent molecular masses of all proteins in the MV or OMV preparations that are reactive with antibodies produced by immunization with CHORI vaccine are summarized in Figure 16.

I. Detection of anti-LOS antibody activity

One of the antigenic determinants on the surface of the meningococci that has been observed to elicit bactericidal antibodies is lipooligosaccharide (LOS). In order to determine whether anti-LOS antibodies were elicited by the CHORI vaccine, a LOS affinity column was prepared and used to absorb out anti-LOS antibodies in the anti-CHORI vaccine antisera using methods described by Shenep et al. (1982, *J. Infect. Dis.* 145: 181-190) with the following modifications. LOS was prepared from each vaccine strain by the method of Appicella et al. (Bacterial Pathogenesis (1997) V. L. Clark and P. M. Bavoil eds. Academic Press, San Diego, CA), and was conjugated to BSA as follows. LOS (1 mg) was combined with BSA (2 mg) in 100 mM MES buffer, pH 5.0. EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl; 100 µl of a 10 mg/ml solution in water) was added with stirring followed by incubation at ambient temperature for 2 hrs. An equal mixture of

the three LOS-BSA conjugates (1 mg LOS-BSA conjugate per ml of hydrated gel) was coupled to CNBr-activated agarose beads (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in sodium carbonate buffer (0.1 M, pH 8.0) overnight at ambient temperature.

After removal of anti-LOS antibodies by passing the anti-CHORI vaccine and anti-CHORI mixed antigen antisera through the LOS affinity column, the antisera were concentrated to their original volume by ultrafiltration and tested for the presence of anti-LOS antibody by ELISA and complement-mediated bactericidal activity against two MenB strains (BZ198 and S3032). As summarized in Figure 17, the presence of anti-LOS antibody was greatly reduced or eliminated by absorption with the LOS-BSA conjugate affinity column. As shown in Figure 18, there was little or no difference in the bactericidal titers between the absorbed and unabsorbed sera from mice or guinea pigs immunized with CHORI vaccine indicating that anti-LOS antibody does not contribute significantly to the bactericidal activity against either a vaccine strain (BZ198) or strain S3032, which has PorA and PorB that are heterologous to the strains used to prepare the vaccine. There was a greater effect on the bactericidal titers of antisera prepared from mice and guinea pigs immunized with Mixed CHORI vaccine indicating a more significant contribution of anti-LOS antibodies to the bactericidal titer in this antisera.

J. Preparation of monoclonal antibodies.

Female CD1 mice (Charles River, Hollister, Calif.) were vaccinated sequentially with MV prepared from meningococcal strain RM1090 (C:2a:P1.5,2), BZ198 (B:NT:7,4), and OMV from strain Z1092 (A:4,21:P1.10). The mice were given three 100 microliters injections, each separated by three weeks, containing 5 micrograms of protein. The first two doses were given subcutaneously together with aluminum phosphate (0.5% wt/vol) and the final dose was given without adjuvant and administered intraperitoneally (i.p.). Three days later, the animals were sacrificed and their spleen cells were fused with myeloma cells (P3X63-AG8.653) at a ratio of 1 spleen cell to 1.7 myeloma cell. After two weeks incubation in HAT selective medium, hybridoma supernatants were screened for antibody binding activity by whole cell ELISA using encapsulated MenB strains 1000 and CU385 as the target antigen. The method described by Abdillahi and Poolman, (Microb Pathog. 1988 4:27-32) was used for the whole cell ELISA assay. Hybridomas secreting antibody that was reactive with both 1000 and CU385 strains in a whole cell ELISA and were positive for

binding by flow cytometry were cloned by limiting dilution and then expanded and frozen for subsequent use in tissue culture.

Antibodies from eight cell lines were characterized in detail. The subclasses of the monoclonal antibodies were determined using an antibody capture ELISA and alkaline phosphatase-conjugated polyclonal antibody specific for each of the mouse IgG subclasses, IgM, IgA, and κ and λ light chains (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Ala.). The monoclonal antibodies produced by the hybridoma clones were harvested from tissue culture media by ammonium sulfate precipitation (55% wt/vol). The concentration of the purified mAb was determined by capture ELISA using Ig standards as recommended by the manufacturer (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Ala.).

K. Reactivity of anti-CHORI antigen mAbs with diverse MenB strains.

The ability of mAbs prepared from mice immunized with anti-CHORI antigen (administered with CFA or aluminum phosphate) to bind to diverse MenB strains was determined by whole cell ELISA (Abdillahi and Poolman, Microb Pathog. 1988 4:27-32). The results are summarized in Figure 19. None of the monoclonal antibodies react with LOS prepared from the immunizing strains. The mAbs 1D9 and 14C7 are reactive with antigens in all or nearly all meningococcal strains tested but not with any non-neisserial strains. The mAb 14C7 is specific for the highly conserved Neisserial surface protein NspA since it is reactive with rNspA expressed in *E. coli*. This mAb also is reactive with strains 8047 and BZ198 but is not reactive with the corresponding strains in which the NspA gene has been inactivated. In contrast to the broadly reactive antibodies, antigens recognized by the mAbs 4B11 and 9B6 are limited to certain strains. Note that MAb 4B11 is reactive with strain 8047 but not with the corresponding 8047 mutant in which the NspA gene has been inactivated. However, mAb 4B11 does not bind to rNspA expressed in *E. coli* vesicles, and also does not bind to strain BZ198, which is known to naturally overexpress (see Moe et al. (1999 Infect. Immun. 67: 5664; Moe et al. Infect Immun. 2001 69:3762). Therefore, mAb 4B11 may recognize a NspA epitope that is specific to strain 8047, or an epitope on another membrane protein that is not present in strain BZ198 but is present and associated with NspA expression in strain 8047. Taken together, the results with the different mAbs show that the anti-CHORI antigen vaccine elicits antibodies against both highly conserved and non-conserved proteins.

L. Bactericidal activity of anti-CHORI antigen mAbs with diverse MenB strains.

The complement-mediated bactericidal activity of mAbs prepared from mice immunized with anti-CHORI antigen and tested against several MenB strains is summarized in Figure 20. The monoclonal antibody 1D9, which reacts by ELISA with all *N. meningitidis* strains tested, was not bactericidal. The monoclonal antibody 14C7, which appears to recognize NspA, was bactericidal or bacteriostatic against all strains tested except BZ198ΔNspA (a knockout of NspA). The activity of the 14C7 monoclonal antibody was superior to that of the control monoclonal antibody AL12 (produced in mice immunized with recombinant NspA (see Moe et al. Infect Immun. 2001 69:3762). This observation suggests that immunization with the CHORI vaccine provides a superior means for eliciting bactericidal anti-NspA antibodies as compared to immunization with a recombinant NspA-based vaccine.

The monoclonal antibody 4B11 (an IgM antibody) was bactericidal against strains 1000 and CU385. Note that the 4B11 monoclonal antibody did not react with these same strains by whole-cell ELISA at the highest concentration tested (see Figure 19). The bactericidal assays measures functional antibody activity using live bacteria whereas the bacterial cell ELISA measures antibody binding to heat-killed bacteria, which in these strains may have denatured the antigenic target of mAb 4B11.

DEPOSITS

A deposit of biologically pure cultures of the materials in the table below was made with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, under the provisions of the Budapest Treaty, on or before the filing date of the present application. The accession number indicated is assigned after successful viability testing, and the requisite fees were paid. Access to said cultures will be available during pendency of the patent application to one determined by the Commissioner to be entitled to such under 37 C.F.R. §1.14 and 35 U.S.C. §122. All restriction on availability of said cultures to the public will be irrevocably removed upon the granting of a patent based upon the application. Moreover, the designated deposits will be maintained for a period of thirty (30) years from the date of deposit, or for five (5) years after the last request for the deposit; or for the enforceable life of the U.S. patent, whichever is longer. Should a culture become nonviable

or be inadvertently destroyed, or, in the case of plasmid-containing strains, lose its plasmid, it will be replaced with a viable culture(s) of the same taxonomic description.

These deposits are provided merely as a convenience to those of skill in the art, and are not an admission that a deposit is required. A license may be required to make, use, or sell the deposited materials, and no such license is hereby granted. The deposit below was received by the ATCC on or before the filing date of the present application.

Description	ATCC Accession No.
Hybridoma 1D9	XX1
Hybridoma 4B11	XX2
Hybridoma 9B8	XX3
Hybridoma 14C7	XX4
MenC strain RM1090	XX5
MenB strain BZ198	XX6
MenA strain Z1092	XX7

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

- 5 1. A method of eliciting broad spectrum protective immunity against *Neisseria meningitidis*, said method comprising the steps of:
- administering to a mammal a first preparation of microvesicles (MVs) from a first *Neisseria meningitidis* species that is a member of a first serotype and of a first serosubtype, in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said first
- 10 preparation; and
- administering to said mammal a second preparation of MVs from a second *Neisseria meningitidis* species that is a member of a second serotype and of a second serosubtype, in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said second preparation;
- 15 wherein the serotype or serosubtype of each of the first, second, and third *Neisseria meningitidis* species is different, and wherein administering of the first, second, and third preparations is sufficient to elicit an immune response in said mammal, wherein said immune response confers protective immunity against a disease caused by more than one strain of *Neisseria meningitidis* species.
- 20
2. The method of claim 1, the method further comprising:
- administering to said mammal a third preparation of outer membrane vesicles (OMV), MVs, or both OMVs and MVs from a third *Neisseria meningitidis* species that is a member of a third serotype and of a third serosubtype, in an amount sufficient to elicit an
- 25 immune response to epitopes present in said third preparation.
3. The method of claim 2, wherein the first, second, and third preparations are administered serially.
- 30
4. The method of claim 3, wherein the preparations are administered such that the first preparation is administered first, the second preparation administered second, and third preparation administered third.

5. The method of claim 1, wherein the first, second, and third preparations are administered as a mixture.

6. The method of claim 1, wherein the third preparation comprises MVs.

5

7. The method of claim 1, wherein the protective immunity conferred is against a disease at least four strains of *Neisseria meningitidis* species.

8. The method of claim 7, wherein protective immunity conferred is against a disease caused by more than one strain of serogroup B *Neisseria meningitidis* species.

10

9. A method of eliciting broad spectrum protective immunity against a disease caused by a member of serogroup B of *Neisseria meningitidis*, said method comprising the steps of:

15

administering to a mammal a first preparation of microvesicles (MVs) from a first *Neisseria meningitidis* species that is a member of a first serosubtype, in a amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said first preparation;

20

administering to said mammal a second preparation of MVs from a second *Neisseria meningitidis* species that is a member of a second serosubtype, in a amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said second preparation;

25

wherein the serosubtype of each of the first and second *Neisseria meningitidis* species is different, and wherein administering of the first and second preparations is sufficient to elicit an immune response in said mammal, wherein said immune response confers protective immunity against a disease caused by at least four strains of *Neisseria meningitidis* species.

10. The method of claim 9, wherein the method further comprises administering to said mammal a third preparation from a third *Neisseria meningitidis* species that is a member of a third serosubtype, the third preparation comprising outer membrane vesicles (OMV), MVs, or both OMVs and MVs, said administering being in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said third preparation, wherein the serosubtype of the first and third species is different.

30

11. The method of claim 10, wherein the serosubtype of the first, second, and third species is different.

12. The method of claim 9, wherein the first and second preparations are administered as a mixture.

13. The method of claim 9, wherein the first and second preparations are administered serially.

14. A method of eliciting broad spectrum protective immunity against a disease caused by a *Neisseria meningitidis* species, said method comprising the steps of:
administering to a mammal a first preparation from a first *Neisseria meningitidis* species, the first preparation comprising outer membrane vesicles (OMV), microvesicles (MV), or both OMV and MV, said administering of the first preparation being in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said first preparation;
administering to the mammal a second preparation from a second *Neisseria meningitidis* species that is genetically diverse to the first *Neisseria meningitidis* species, the second preparation comprising outer membrane vesicles (OMV), microvesicles (MV), or both OMV and MV, said administering of the second preparation being in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said second preparation;
wherein administering of the first and second preparations elicits an immune response in said mammal, wherein said immune response confers protective immunity against a disease caused more than one strain of *Neisseria meningitidis* species.

15. The method of claim 14, comprising the additional step of administering to said mammal a third preparation of outer membrane vesicles from a third *Neisseria meningitidis* species, which third species that is genetically diverse to at least the first *Neisseria meningitidis* species, said administering being in an amount sufficient amount to elicit an immune response to epitopes present in said third preparation.

16. A method for eliciting broad spectrum protective immunity against a disease caused by a *Neisseria meningitidis* species, said method comprising the steps of:

administering to a mammal a first antigen preparation from a first *Neisseria meningitidis* species, said administering of the first preparation being in an amount sufficient
5 to elicit an immune response to epitopes present in said first preparation;

administering to the mammal a second antigen preparation from a second *Neisseria meningitidis* species that is genetically diverse to the first *Neisseria meningitidis* species, said administering of the second preparation being in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said second preparation;

10 wherein administering of the first and second preparations elicits an immune response in said mammal, wherein said immune response confers protective immunity against a disease caused more than one strain of *Neisseria meningitidis* species.

17. The method of claim 16, wherein the method further comprises administering to
15 the mammal a third antigen preparation from a third *Neisseria meningitidis* species that is genetically diverse to at least the first *Neisseria meningitidis* species, said administering of the third preparation being in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present in said second preparation;

20 18 The method of claim 16 wherein the first and second antigen preparations are administered serially.

19 The method of claim 16 wherein the first and second antigen preparations are administered as a mixture.

25 20 The methods of claims 1, 9, 14 or 16 wherein the OMV and MV preparations are administered together with pharmaceutically acceptable excipients.

21. The method of claims 1, 9, 14 or 16, wherein the excipients comprise an
30 adjuvant.

22. The method of claims 1, 9, 14 or 16, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum hydroxide, alum or MF59.

23. The method of claims 1, 9, 14 or 16, wherein administering is by injection.

24. The method of claims 1, 9, 14 or 16 wherein administering is oral or by aerosol
5 administration.

25. The method of claims 1, 9, 14 or 16, wherein the mammal is a human.

26. The method of claim 25, wherein the human is immunologically naïve with
10 respect to *Neisseria meningitidis*.

27. The method of claim 25, wherein the human is a human child less than five years
old.

15 28. A method of identifying an antigenic epitope that elicits broad spectrum
protective immunity against a disease caused by *Neisseria meningitidis* species, said method
comprising the steps of:

administering to a mammal a first preparation of outer membrane vesicles (OMV),
microvesicles (MV), or both OMV and MV from a first *Neisseria meningitidis* species, said
20 administering being in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes present
in said first preparation;

administering to said mammal at least a second preparation of outer membrane
vesicles (OMV), microvesicles (MV), or both OMV and MV of a second *Neisseria*
meningitidis species, in an amount sufficient to elicit an immune response to epitopes
25 present in said second preparation, wherein the second *Neisseria meningitidis* spp is
genetically diverse to the first *Neisseria meningitidis* spp, and wherein said administering of
the first and second preparations is sufficient to elicit an immune response to at least one
epitope present in said first and second preparations, and wherein said response confers
protective immunity against a disease caused by *Neisseria meningitidis* species; and

30 identifying at least one epitope that elicits broad spectrum protective immunity
against a disease caused by *Neisseria meningitidis* species.

29. A composition comprising:

a first preparation selected from the group consisting of outer membrane vesicle (OMV), microvesicles (MV), or both OMV and MV from a first *Neisseria meningitidis* species; and

5 a second preparation selected from the group consisting of outer membrane vesicle (OMV), microvesicles (MV), or both OMV and MV from a second *Neisseria meningitidis* species, wherein the second *Neisseria meningitidis* spp is genetically diverse to the first *Neisseria meningitidis* species; and

a pharmaceutically acceptable carrier.

10

30. The composition of claim 29, further comprising:

a third preparation selected from the group consisting of outer membrane vesicle (OMV), microvesicles (MV), or both OMV and MV from a third *Neisseria meningitidis* species, wherein the third *Neisseria meningitidis* species is genetically diverse to the first

15 *Neisseria meningitidis* species.

31. The composition of claim 30, wherein:

the first preparation comprises MV;

the second preparation comprises MV; and

20 the third preparation comprises OMV.

32. The composition of claim 29, wherein the first and second *Neisseria meningitidis* species are genetically diverse in that they differ in at least one of serotype, or serosubtype.

25 33. The composition of claim 31, wherein the first and third *Neisseria meningitidis* species are genetically diverse in that they differ in at least one of serotype, or serosubtype.

34. A composition comprising:

30 at least one isolated *Neisseria meningitidis* antigen, the isolated antigen being present in the composition in an amount effective to elicit an immune response in a mammalian host, and being characterized as a protein immunoprecipitated with anti-sera produced following vaccination of a mammal with the composition of claim 31, and having an apparent

molecular mass selected from the group consisting of about 80 kDa, about 59.5 kDa, about 40.7 kDa, about 39.6 kDa, about 33 kDa, about 27.9 kDa, and 14.5 kDa; and
a pharmaceutically acceptable excipient.

5 35. A composition comprising:

at least one isolated *Neisseria meningitidis* antigen, the isolated antigen being present in the composition in an amount effective to elicit an immune response in a mammalian host, and being characterized as a protein detected by Western blot with anti-sera produced following vaccination of a mammal with the composition of claim 31, and having an
10 apparent molecular mass selected from the group consisting of about 53 kDa to 57 kDa; about 46-47 kDa, about 33 kDa, about 20 kDa to 21 kDa; and about 18 kDa; and
a pharmaceutically acceptable excipient.

 36. A composition comprising:

15 at least one isolated *Neisseria meningitidis* antigen, the isolated antigen being present in the composition in an amount effective to elicit an immune response in a mammalian host, wherein the antigen is from a protein that specifically binds a monoclonal antibody selected from the group consisting of 1D9 (ATCC Accession No. xx), 4B11 (ATCC Accession No. xx), 9B8 (ATCC Accession No. xx), and 14C7 (ATCC Accession No. xx); and
20 a pharmaceutically acceptable excipient.

37. The composition of claim 34, 35, or 36, wherein the composition comprises at least two isolated *Neisseria meningitidis* antigens.

25 38. A composition comprising isolated *Neisseria meningitidis* antigens, wherein said antigens are identified by the method of claim 28.

39. A method for eliciting broad spectrum protective immunity against a disease caused by a *Neisseria meningitidis* species, said method comprising administering to a
30 mammal the composition of claim 34, 35, 36, or 38.

FIG. 1. Summary of meningococcal outer membrane vesicle vaccine efficacy trials*

Years of the Study	Vaccine Strain	Location (population vaccinated)	Age (years)	Estimated Efficacy (%)
1987-89	B:4:P1.15	Cuba	11 to 16	83
	C PS /alum	(100,000 school children)		
1989-90	B:4:P1.15	Sao Paolo, Brazil	2 to 4	47
	C PSb/alum	(300,000 children)	4.1 to 7	74
1990-91	B:4:P1.15	Rio de Janeiro, Brazil	3/12 to 7	58
	C PS/alum	(2.4 million children)	4. to 7	71
1988-90	B:4:P1.3	Iquique, Chile	1 to 3.9	-23
	C PS/alum	(40,000 children)	4 to 21	70
1989-91	B:15:P1.7,16 alum	Norway (171,800 school children)	14. to 16	57

*Adapted from Frasch (1995, in MENINGOCOCCAL DISEASE, K. Cartwright (ed.), Wiley, New York, NY, p. 266). In Norway, two doses of vaccine were given separated by 6 weeks. Efficacy was 87% in the first year and then declined during the subsequent 18 months follow-up, so that overall efficacy was 57%. C PS=Serogroup C polysaccharide vaccine that is mixed with the vesicles. Alum preparations were Al(OH)₃

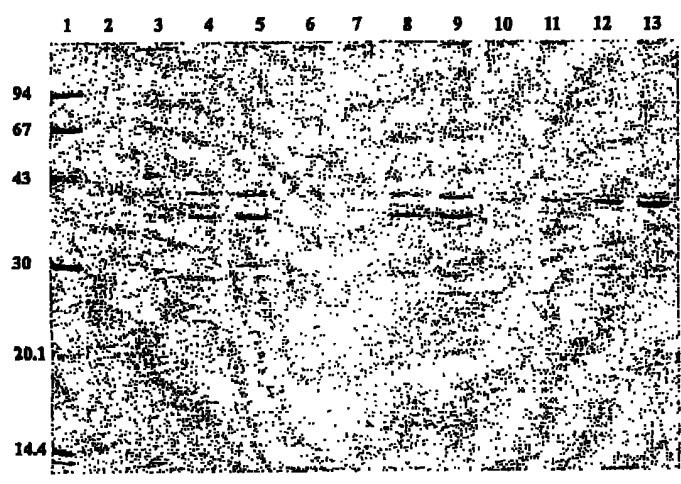


FIG. 2

FIG. 3.

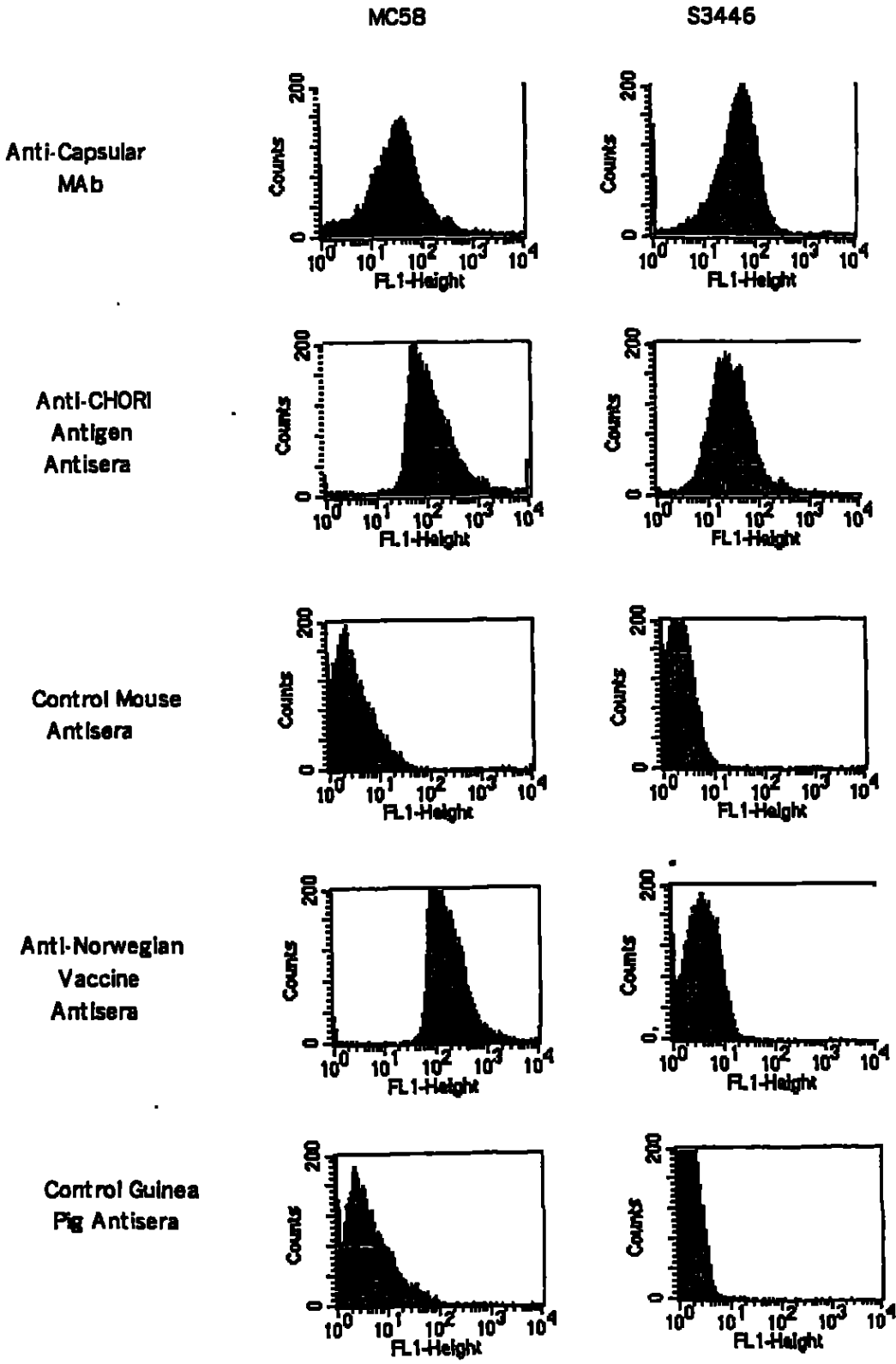


FIG 4 Bacterial cell surface binding of antisera determined by indirect fluorescence flow cytometry

Strain (serosubtype)	PorA heterologous to CHORI vaccine strains ⁺⁺⁺	Surface reactivity by indirect fluorescence flow cytometry (1/titer) ⁺		
		Anti-CHORI ⁺⁺	Anti-Norway ⁺⁺	Anti-NspA ⁺⁺
1000 (5)	-	>200	>200	20
2996 (5,2)	-	2000	<20	20
8047 (5,2)	-	>200	<20	>20
BZ198 (4)	-	2000	200	>20
CU385 (19,15)	+	>200	<20	>20
IH5341 (7,16)	+	>200	>200	<20
M136 (P-)	+	<20	<20	<20
M986 (5,2)	-	2000	<20	<20
MC58 (7,16)	+	200	>200	<20
NG3/88 (1)	+	200	200	<20
NMB (5,2)	-	2000	ND	>20
S3446 (23,14)	+	200	<20	<20

⁺Titer is defined as the dilution required to give 50% of fluorescence (FL1-Height) of 10 or greater over background fluorescence of cells in the presence of control sera.

⁺⁺Anti-CHORI antisera prepared in mice by sequential immunization with MV from strain RM1090 (C 2a,P1 5,2), then with MV from strain BZ198 (B.NT.P1 4) followed by OMV from strain Z1092 (A 4,21,P1 10) (see text) Anti-Norway refers to antiserum from guinea pigs given two injections of OMV vaccine prepared from strain H44/76 (B 15 P1 7,16) by the National Institute of Public Health ("MenB-Folkehelse"), Oslo, Norway Anti-NspA refers to antisera prepared in CD1 mice given three injections of recombinant NspA as described by Moe et al (1999 Infect Immun 67 5664)

⁺⁺⁺Serosubtype (PorA) differs from those of the three strains used to prepare the vaccine (see FIG 21 and 22)

WO 02/096413

4/23

PCT/US01/23842

FIG 5 Reactivity of CHORI antisera against N meningitidis serogroup A and C strains

Strain (serogroup serosubtype)		Bactericidal Activity (1/titer)*		Surface binding by indirect fluorescence flow cytometry (1/titer)*	
		Negative control sera	Anti- CHORI	Negative control sera	Anti- CHORI
60B (C P1 7,1)		<10	>250	<20	~2000
Z1073 (A P1 3,6)		<10	>250	ND	>>100

*Dilution of serum yielding 50% decrease in colony forming units (CFU) per ml after 60 minutes incubation of bacteria in the presence of human complement as compared to CFU/ml at time zero of controls (see FIG 6 below)
+See footnotes to FIG 4 and text

WFO 02/09/643

5/23

PCT/US01/23842

FIG 6 Results of a bactericidal assay testing anti-CHORI antigen, anti-rNspA, and anti-Norwegian vaccine antisera against meningococcal B strain 2996

Complement	Animal source of sera or mAb	Antibody/Antisera*	Final Concentration /Dilution	CFU/20 µl 0'	CFU/20 µl 60'	% Survival
None	-	None	0	189	250	132
None	-	None	0	171	250	146
Active	-	None	0	175	250	143
Inactive	-	None	0	180	250	139
Active	-	Complement	1 5	190	250	132
Active	Mouse	Anti-capsular mAb	200µg/ml		1	1
Active	Mouse	Anti-capsular mAb	100µg/ml		43	24
Active	Mouse	Anti-capsular mAb	50µg/ml		225	124
Inactive	Mouse	Anti-capsular mAb	200µg/ml		230	127
Active	Mouse	Anti-rNspA	1 10		250	138
Active	Mouse	Anti-rNspA	1 50		250	138
Active	Mouse	Anti-rNspA	1 250		250	138
Active	Mouse	Anti-CHORI antigen	1 10		0	0
Active	Mouse	Anti-CHORI antigen	1 50		2	1
Active	Mouse	Anti-CHORI antigen	1 250		55	30
Active	Mouse	Anti-E coli control	1 10		>250	138
Active	Guinea pig	Anti-Norwegian vaccine	1 5		220	122
Active	Guinea pig	Anti-Norwegian vaccine	1 25		245	135
Active	Guinea pig	Anti-Norwegian vaccine	1 125		250	138
Active	Guinea pig	Anti-alum control	1 5		250	138

*See footnotes to FIG 4 and text

W/O 02/09643

6/23

PCT/US01/23842

FIG 7 Complement-mediated bactericidal activity of antisera and antibodies.

Strain (serosubtype)	PorA heterologous to CHORI vaccine strains	Bactericidal activity (1/titer) +		
		Anti-CHORI	Anti-Norway	Anti-NspA
1000 (5)	-	130	>125	<10
2996 (5,2)	-	>250	<5	<10
8047 (5,2)	-	>250	<5	<10
BZ198 (4)	-	>250	I ⁺⁺	110
CU385 (19,15)	+	>250	<25	<10
IH5341 (7,16)	+	>250	I ⁺⁺	<10
M136 (P-)	+	<10	<5	<10
M986 (5,2)	-	>250	<5	<10
MCS8 (7,16)	+	>250	>125	<10
NG3/88 (1)	+	13	9	<10
NMB (5,2)	-	>100	<5	16
S3446 (23,14)	+	10	<5	<10

+See footnotes to FIGS 4 and 5 and text. Titer > refers to highest dilution tested, titer < refers to lowest dilution tested
++I, indeterminate due to the presence of bactericidal activity in the negative control antisera against this strain

FIG 8. Complement-mediated bactericidal activity of antisera from mice immunized with the indicated vaccines

Strain (serosubtype)	PorA heterologous to CHORI vaccine strains ⁺⁺⁺	Bactericidal activity (1/iter) ⁺⁺⁺			
		CHORI CFA ⁺ (N=7)	CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃ ⁺ (N=7)	CHORI MIX/ Al ₂ (OPO ₄) ₃ ⁺ (N=10)	E COLI MV/ Al ₂ (OPO ₄) ₃ (N=10)
1000 (5)	-	20	128	6	<4
8047 (5,2)	-	125	300	125	<25
BZ198 (4)	-	650	220	1000	<4
BZ198 NspA (4)	-	317	131	235	<4
BZ83 (10)	-	275	109	205	<25
CU385 (19,15)++	+	>128	128	<4	<5
H44/76 (7,16)	+	>128	>128	21	6
M136 (P-)	+	100	<4	5	<4
M986 (5,2)	-	193	101	133	<4
MC58 (7,16)++	+	47	8	7	<4
NG3/88 (7,1)	+	<4	4	<4	<4
NGP165 (5,2)	-	82	120	90	<4
NMB (5,2)	-	183	441	141	<4
S3032 (12,16)	+	125	400	230	<25
S3446 (22,14)	+	18	<4	<4	<4

+CHORI/CFA, sequential immunization with a 5 µg dose of strain RM1090 (C 2a, P1 5,2) MV with CFA, strain BZ198 (B NT P1 4) MV with IFA, and strain Z1092 OMV (A.4,21 P1 10) without adjuvant; CHORI/Al₂(OPO₄)₃ same as CHORI/CFA except using aluminum phosphate as an adjuvant; CHORI MIX/Al₂(OPO₄)₃, same as CHORI/Al₂(OPO₄)₃ except each 5 µg dose contained an equal mixture of the three MV/OMV preparations, E. COLI MV/Al₂(OPO₄)₃ MV prepared from E. coli strain BL21(DE3)

++w/glu, cell culture grown in the presence of 0.3% glucose⁺⁺⁺ See footnotes and text of FIG 4

W0 02/09643

8/23

PCT/US01/23842

FIG 9 Bactericidal activity of antisera from guinea pigs immunized with the indicated vaccines⁺

Strain (serosubtype) ⁺⁺	PorA heterologous to CHORI vaccine strains ⁺⁺⁺	Bactericidal activity (1/iter) ⁺⁺⁺		
		CHORI/Al ₂ (OPO ₄) ₃ (N=8)	CHORI/Al(OH) ₃ (N=3)	E COLI MV/Al ₂ (OPO ₄) ₃ (N=6)
M136 (P-)	+	<4	<4	<4
S3446 (22,14)	+	6	4	<4
CU385 (19,15)	+	12	5	<4
1000 (5)	-	64	16	<4
H44/76 (7,16)	+	64	16	<4
BZ83 (10)	-	24	12	<4
8047 (5,2)	-	>128	100	<4
BZ198 (4)	-	28	6	<4
BZ198ΔNspA (4)	-	19	5	<4
NG3/88 (7,1) ⁺⁺	+	9	5	<4

⁺CHORI/Al₂(OPO₄)₃, sequential immunization with a 5 microgram dose of strain RM1090 (C 2a,P1 5,2) MV, strain BZ198 (B NT P1 4) MV, and strain Z1092 OMV (A.4,21 P1 10) aluminum phosphate as an adjuvant, CHORI/Al(OH)₃, same as CHORI/Al₂(OPO₄)₃ except using aluminum hydroxide as an adjuvant, E COLI MV/ Al₂(OPO₄)₃, MV prepared from E. coli strain BL21(DE3)

⁺⁺All strains were grown in the presence of 0.3% glucose except for strains M136 and NG3/88

⁺⁺⁺See footnotes and text of FIG 4

WO 02/09643

9/23

PCT/US01/23412

FIG 10 Passive protection in infant rats against meningococcal B strain 8047 bacteremia by antisera and antibodies +

Treatment**	Dose/rat or Serum Dilution (100 microliters)	Blood Culture Obtained at 18 hrs	
		No Positive/total no	Geo Mean, 10 ³ CFU/ml
Anti-Capsular mAb	10 micrograms	0/5	<1
PBS control	-	5/5	>200
Anti-B. coli control	1 20	5/5	>200
Anti-CHORI	1 20	0/5	<1
Anti-Norway	1 20	5/5	83
Alum control	1 20	5/5	178

+Animals were pretreated at time 0 with control or test antibodies and challenged 2 hours later with 5 x 10³ colony forming units of log phase N meningitidis strain 8047 given IP

++See footnotes to FIG 4 and text.

FIG 11 Passive protection in infant rats against meningococcal B strain 8047 bacteremia by guinea pig antisera

Treatment*	Dose/rat or Serum Dilution (100 microliters)	Blood Culture Obtained at 18 hrs	
		No Positive/total no	Geo Mean, 10 ⁴ CFU/ml
Pre-immunization	1 10	6/6	21.9
Anti-CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃	1 10	0/6	<0.001
Anti-CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃	1 100	4/6	1.3
Anti-CHORI/ Al ₂ (OPO ₄) ₃	1 1000	6/6	193
Anti- CHORI/Al(OH) ₃	1 10	0/6	<0.001
Anti- CHORI/Al(OH) ₃	1 100	6/6	47.4
Anti- CHORI/Al(OH) ₃	1 1000	6/6	32.0
Anti-E coli MV	1 10	6/6	110
Mouse anti-capsular mAb (SEAM 3)	20 µg	3/3	1.4

*See footnotes to FIGS 9 and 10 and text.

WO 02/09643

12/23

PCT/US01/23842

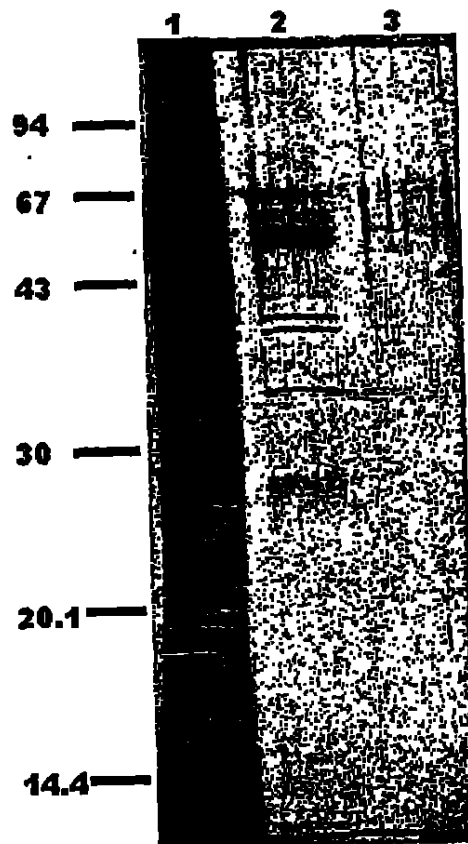


FIG. 12.

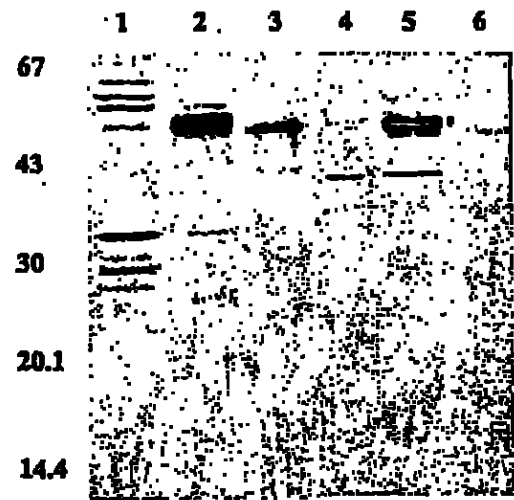


FIG. 13

FIG 14 Bacterial surface accessible proteins precipitated by pooled antisera from mice sequentially immunized with MenC strain RM1090 MV, MenB strain BZ198 MV, and MenA strain Z1092 OMV

Strain/Sample	Serotype subtype*	Precipitated Proteins (by apparent mass in kDa)		
		37-41	31-33	<30
RM1090MV	2a P1 5,2 L3,7	40 7, 39 6	32	
BZ198 MV	NT NST	37 1, 35 1	32,30	
Z1092 OMV	4,21 P1 10	40 7, 39 1, 38 6, 37 6	33 1, 32 5, 31 5	
BZ198	NT NST	-	32 5	14 5
CU385	4,7 P1 19,15		32 4	
MC58	15 P1 7,16		32 9	
NG3/88	8 P1 1		32 9	25 7
NMB	2b P1 5,2	40 7, 39 6	33	14 5
S3446	19,14 P1 23,14		32 9	25 7

*See text and footnotes of Tables 21 and 22 (below)

FIG 14A Bacterial surface accessible proteins precipitated by pooled antisera from mice sequentially immunized with MenC strain RM1090 MV, MenB strain BZ198 MV, and MenA strain Z1092 OMV

Strain	Serotype subtype ⁺	Precipitated Proteins (by apparent mass in kDa)							
		>45		36-45		25-35		<25	
		Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2
BZ198	NT NST	80		36,39,43	37,40	28,30	28	14,5	12
CU385	4,7 P1 19,15	80		38,42	42	30,34		10	11
1000	NT P1 5		ND	41,45	ND	26	ND		ND

⁺See text and footnotes of FIGS 21 and 22 (below) Expts 1 and 2 refer to experiments performed with immune serum pools from different groups of mice immunized with different CHORI vaccine preparations ND= not done (strain 1000 tested with immune serum from one group of immunized mice)

WO 02/09643

1423

PCT/US01/23842

21

WO 02/09643

PCT/US01/23842

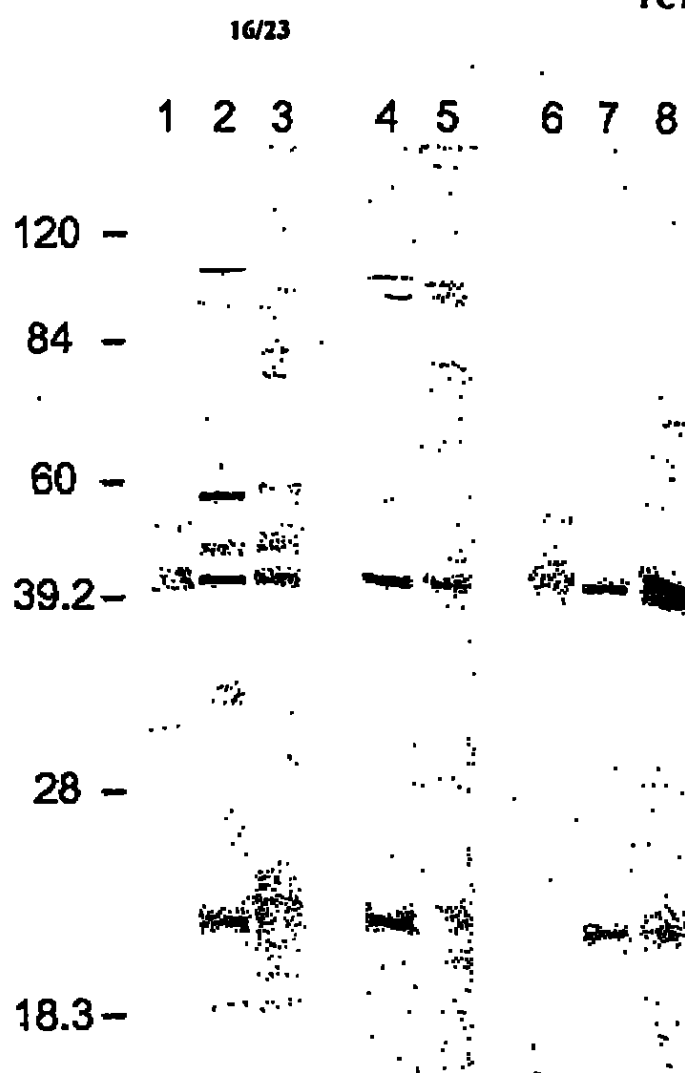


FIG. 15

85

FIG 16 Proteins reactive with anti-CHORI antigen antisera by Western blot of MV and OMV preparations

Mouse anti-CHORI/CFA antisera ⁺			Mouse anti-CHORI Al ₂ (OPO ₃) ₂ ⁺		Guinea pig anti-CHORI/Al ₂ (OPO ₃) ₂ antisera ⁺⁺		
RM1090 MV	BZ198 MV	Z1092 OMV	BZ198 MV	Z1092 OMV	RM1090 MV	BZ198 MV	Z1092 OMV
	119			116			
108				107			
101		101	101	99			
	96	97	95	94			
	93	93	91	92			92
		88					
		81		78			
		76					76
67	67	69		67	66		68
				64	62		64
53*	56*	57*	56	51	53	55	59
	50	50					
46*	47*	47*	47	46	47	46	46
	36	38				34	
33*	33*	35*	33	33	32	33	33
	27				24		
	20*	21*	20	21		20	
		19		19	19		19
	18*	18*	18	18			

⁺See footnote and text of FIG 8

⁺⁺See footnote and text of FIG 9

*Indicates proteins most reactive with CHORI/CFA antisera and common to at least two of the three vaccine preparations.

FIG 17 Reactivity of anti-CHORI antisera with LOS by ELISA

Antisera ⁺	RM1090 LOS (1/titer) ⁺⁺		BZ198 LOS (1/titer) ⁺⁺		Z1092 LOS (1/titer) ⁺⁺	
	Unabsorbed	Absorbed ⁺⁺⁺	Unabsorbed	Absorbed ⁺⁺⁺	Unabsorbed	Absorbed ⁺⁺⁺
Mouse anti-CHORI	<100	<100	900	<100	150	<100
Mouse anti-CHORI mix	900	100	200	<100	600	100
Guinea pig anti-CHORI	<100	<100	350	100	<100	<100
Guinea pig anti-CHORI mix ⁺⁺⁺	<100	<100	300	100	<100	<100

+ See footnotes and text of FIG 8 and 9

⁺⁺Titer is defined as the dilution of serum giving an OD 405 nm of 0.5 after 1 hr incubation with substrate

⁺⁺⁺Same as used to prepare mouse anti-CHORI antisera mix (see FIG 8) except that total dose of 25 micrograms protein was given rather than 5 micrograms

⁺⁺⁺⁺After incubation with LOS-BSA coupled to Sepharose (see text)

FIG 18. Bactericidal activity of anti-CHORI antisera before and after absorption of anti-LOS antibodies

Serum ^{***}	Strain BZ198 (1/titer) [*]		Strain S3032 (1/titer) [*]	
	Unabsorbed	Absorbed ^{**}	Unabsorbed	Absorbed ^{**}
Mouse anti-CHORI	49	28	259	247
Mouse anti-CHORI MIX	350	111	234	102
Guinea pig anti-CHORI	125	93	13	5
Guinea pig mix	77	31	<5	14

^{*}See footnote and text to FIG 5

^{**}After incubation with LOS-BSA coupled to Sepharose (see text)

^{***}See footnote and text to FIG 17

FIG 19 Reactivity of mAbs produced by immunization with CHORI vaccine with bacterial strains, LOS, and rNspA by ELISA

Strain+	[mAb] (ng/ml) giving OD 405 nm = 0.5 after 1 hr incubation with substrate				
	1D9 (IgG2a)	4B11 (IgM)	9B8 (IgG3)	14C7 (IgG3)	Anti-NspA mAb ALA ⁺⁺⁺ (IgG2a)
Nm 1000	500	>720 ⁺⁺	>3970	7380 ⁺	1000
Nm 4335	500	>720	13	30	30
Nm 8047	200	2.4	>3970	10	20
Nm 8047ΔNspA	600	>720	>3970	>7380	>5400
Nm BZ198	600	>720	16	2	20
Nm BZ198 ΔNspA	600	>720	16	>7380	>5400
Nm BZ83	600	>720	>3970	273	80
Nm CU385	600	>720 ⁺⁺	>3970	>7380 ⁺⁺	180
Nm M136	600	>720	>3970	36	400
Nm M3966	1000	>720	>3970	0.5	50
Nm M986	800	>720	>3970	5	400
Nm NG3/88	600	0.8	>3970	1	70
Nm NGE31	500	>720	>3970	5	100
Nm NGF26	600	2.4	>3970	0.4	40
Nm S3446	500	>720	>3970	0.2	40
Hi Minn A	>8300	>720	>3970	>7380	ND
Hi Eagan	>8300	>720	>3970	>7380	ND
Nm RM1090 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	ND
Nm BZ198 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	ND
Nm Z1092 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	ND
rNspA MV	>8300	>720	>3970	28	6

+Nm, *Neisseria meningitidis*, Hi, *Haemophilus influenzae*

++Although negative by ELISA, 14C7 is bactericidal for these strains (see FIG 20)

+++ See Moe et al Infect Immun 2001 69 3762)

W/O 02/06/13

21/23

PCT/US01/23842

27

87

FIG 20 Bactericidal activity of mAbs produced by immunization with CHORI vaccine.

Strain (serosubtype)	PorA heterologous to CHORI vaccine strains ⁺	mAb tested for bactericidal activity ⁺⁺				
		1D9	4B11	9B8	14C7	AL12 ⁺⁺
1000	-	-	+	-	+	+
BZ198	-	-	static	+	+	+
BZ198ΔN spA	-	-	-	+	-	-
CU385	+	-	+	-	+	-
M986	-	-	-	-	+	-
NG3/88	+	-	static	-	static	-

⁺See text and footnotes of FIG 4

⁺⁺ + refers to bactericidal when tested at less than or equal to 100 micrograms/ml, static refers to a percent survival of CFU/ml at 60 min is greater than 50% but less than 100% (see FIG 6)

⁺⁺⁺ Moe et al Infect Immun 2001 69 3762

881

FIG 21 Meningococcal serotype and serosubtype defining monoclonal antibodies available from RIVM*

Serotyping reagents			Serosubtyping reagents		
Monoclonal	Type	Ig	Monoclonal	Type	Ig
MN3C6B	1	G2b	MN14C2 3	P1 1	G2a
MN2D3F	2A	G2a	MN16C13F4	P1 2	G2a
MN2C3B	2B	G2a	MN20B9 34	P1 4	G2a
MN14G21	4D	G2a	MN22A9 19	P1 1 5	G2a
MN5C8C	14	G2a	MN19D6 13	P1 6	G3
MN15A14H6	15	G2a	MN14C11 6	P1 7	G2a
			MN5A10F	P1 9	G2a
			MN5A10F	P1 9	G2a
			MN20F4 17	P1 10	G2b
			MN20A7 10	P1 12	G3
			MN24H10 75	P1 13	G2a
			MN21G3 17	P1 14	G3
			MN3C5C	P1 15	G3
			MN5C11G	P1 16	G2b

*Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), P O Box 457, 3720 AL Bilthoven, The Netherlands (reference *FEMS Microbiology Letters* 48 (1987) 367-371)

FIG 22 Serogroup, serotype, and serosubtype defining monoclonal antibodies available from NIBSC*

Serogroup	Cat No	Serotype	Cat. No	Serosubtype	Cat. No
A	95/674	P2 2a	95/682	P1 1	95/694
B	95/750	P2 2b	95/684	P1 10	95/710
C	95/678	P3 1	95/680	P1 12	95/712
		P3 14	95/688	P1 13	95/714
		P3 15	95/690	P1 14	95/716
		P3 21	95/692	P1 15	95/718
		P3 4	95/686	P1 16	95/720
				P1 2	95/696
				P1 3	95/698
				P1.4	95/700
				P1 5	95/702
				P1 6	95/704
				P1 7	95/706
				P1 9	95/708

*National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Division of Bacteriology, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts., EN6 3QG, United Kingdom.

SEQUENCE LISTING

<110> Granoff, Dan
Moe, Gregory R.

<120> VACCINES FOR BROAD SPECTRUM PROTECTION
AGAINST DISEASES CAUSED BY NEISSERIA MENINGITIDIS

<130> CHOR-001WO

<140> Unassigned

<141> 2001-07-27

<150> US 60/221,495

<151> 2000-07-27

<160> 1

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CpG nucleotides

<400> 1

tccatgacgt tcttgacgtt

20

**VACUNAS PARA PROTECCIÓN DE ESPECTRO AMPLIO CONTRA
ENFERMEDADES CAUSADAS POR *NEISSERIA MENINGITIDIS***

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de ya sea la solicitud provisional de E.U. presentada anteriormente no. de serie 60/221,495, presentada el 27 de Julio de 2000, tal solicitud se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

10 **DECLARACIÓN QUE CONSIDERA INVESTIGACIÓN FEDERALMENTE
PATROCINADA**

 Esta invención se hace con soporte del gobierno bajo garantías no. AI46464 y AI45642 asignadas al National Institute of Allergy and Infectious Disease, y el National Institute of Health. El gobierno puede tener ciertos
15 derechos en esta invención.

CAMPO DE LA INVENCION

 Esta invención se refiere a vacunas de espectro amplio para la
prevencción de enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis*,
20 especialmente serogrupo B.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Neisseria meningitidis es una bacteria gramnegativa que coloniza el tracto respiratorio superior humano y es responsable de brotes epidémicos
25 cíclicos y esporádicos por todo el mundo de, más notablemente, meningitis y sepsis. Las tasas de morbilidad y ataque son más elevadas en niños de menos de 2 años de edad.

Como otra bacteria gramnegativa, *Neisseria meningitidis* típicamente posee una membrana citoplásmica, una capa de péptidoglican, una membrana exterior que junto con el polisacárido capsular constituyen la pared bacteriana, y pelos que se proyecta hacia el ambiente exterior. Estas estructuras de superficie median la infección e interactúan con el sistema inmune huésped. Por ejemplo, una primer etapa de infección con *Neisseria* es la adherencia a células objetivo, que se enseña que se media por los pelos y, posiblemente, otras adhesinas tales como Opc. Se ha reportado que los componentes de polisacárido, fosfolípido y proteína de las membrana exterior producen una respuesta inmune.

Neisseria meningitidis spp puede dividirse en grupos serológicos, tipos y subtipos en la base de reacciones con anticuerpos policlonales (Frasch, C.E. and Chapman, 1973, *J. Infect. Dis.* 127:149-154) o monoclonales (Hussein, A., MONOCLONAL ANTIBODIES AND *N. MENINGITIDIS*. Proefschrift. Utrecht, Nederland, 1988) que interactúan con diferentes antígenos. El seroagrupamiento se basa en variaciones inmunológicamente detectables en el polisacárido capsular. Aproximadamente 12 serogrupos se conocen: A, B, C, X, Y, Z, 29-E, W-135, H, I, K y L (Ashton, F.E. et al., 1998, *J. Clin. Microbiol.* 17:722-727; Branham, S.E. 1956, *Can. J. Microbiol.* 2: 175-188; Evans, A. C.; 1920, *Lab. Bull.* 1245:43-87; Shao-Qing, et al., 1972, *J. Biol. Stand.* 9:307-315; Slaterus, K.W., 1961, Ant. V. Leeuwenhoek, *J. Microbiol. Serol.* 29:265-271). Actualmente, el serogrupo B (MenB) es responsable por aproximadamente la mitad a 80% de las enfermedades por *Neisseria meningitidis* invasiva reportadas.

La serotipificación se basa en anticuerpos antigénicos definidos por el anticuerpo monoclonal en una proteína de membrana exterior llamada Porin B (PorB). Los anticuerpos que definen aproximadamente 21 serotipos son

actualmente conocidos (Sacchi *et al.*, 1998, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5:348). La serotipificación se basa en variaciones antigénicas definidas por el anticuerpo en una proteína de membrana exterior llamada Porin A (PorA). Los anticuerpos que definen aproximadamente 18 serosubtipos son actualmente
5 conocidos. La serosubtipificación es especialmente importante en cepas de *Neisseria meningitidis* en donde la inmunidad puede ser específica de serosubtipo. Más variabilidad entre proteínas PorA ocurre en dos (ondas I y IV) de ocho ondas expuestas a la superficie, putativas. Las ondas variables I y IV se han designado VR1 y VR2, respectivamente. Ya que existen más variantes
10 de secuencia VR1 y VR2 de PorA que no se han definido por anticuerpos específicos, una nomenclatura alternativa en base al tipo VR de secuencia de aminoácidos deducida de secuenciación de ADN se ha propuesto (Sacchi *et al.*, 2000, *J. Infect. Dis.* 182:1169, ver también el sitio web Multio Locus Sequence Typing). Los lipopolisacáridos también pueden utilizarse como antígenos de
15 tipificación, dando origen a dichos inmunotipos así llamados: L1, L2, etc.

Neisseria meningitidis también puede dividirse en grupos clonales o subgrupos, utilizando varias técnicas que caracterizan directa o indirectamente el genoma bacteriano. Estas técnicas incluyen electroforesis de enzima multilugar (MLEE), en base a variación de movilidad electroforética de una
20 enzima, que refleja los polimorfismos subyacentes en un lugar genético particular. Al caracterizar las variantes de un número de tales proteínas, la "distancia" genética entre dos cepas puede inferirse de la proporciones de desigualdades. De manera similar, la clonación entre dos aislados puede inferirse si los dos tienen patrones idénticos de variantes electroforéticas en
25 número de lugares. Más recientemente, la tipificación de secuencia de multilugar (MLST) ha reemplazado a MLEE como el método de elección para caracterizar los microorganismos. Utilizando MLST, la distancia genética

entre dos aislados, o clonación se infiere de la proporción de desigualdades en las secuencias de ADN de 11 genes de resguardo en cepas de *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140).

Dada la prevalencia e importancia económica de infecciones por *Neisseria meningitidis* invasiva, no es sorprendente que se han hecho muchos intentos para desarrollar tratamientos. Aunque estas infecciones pueden tratarse con antibióticos, aproximadamente 10 a 20% de los pacientes tratados mueren, y muchos supervivientes se dejan con secuelas neurológicas permanentes, tales como amputación, pérdida auditiva neurosensorial y parálisis. También, los microorganismos pueden desarrollar resistencia antibiótica. De esta manera, la prevención con vacunas es un modo preferible para contener la difusión de la infección.

Debido a que la cápsula de polisacárido es una de las estructuras más exteriores de *Neisseria meningitidis* patogénica, ha sido un foco principal de los intentos para desarrollar vacunas. Diferentes preparaciones de polisacáridos capsulares se han utilizado para controlar los brotes y epidemias de los serogrupos A, C, Y y W-135, como vacunas mono-, di-, tri- o tetravalentes (Gold *et al.*, 1969-1970, *Bull WHO* 45:272-282; Gotschlich *et al.*, 1969, *J. Exp. Med.* 129:134-136; Hankins, 1982, *Proc. Soc. Biol. Med.* 169:54-57; Patente de E.U. No. 6,080,589). Sin embargo, las vacunas de polisacárido capsular padecen de: deficiente o ninguna respuesta al polisacárido C en niños de menos de 2 años; termolabilidad de polisacárido A; dificultades que consideran la inducción de tolerancia inmunológica después de la vacunación o re-vacunación con polisacárido C (Granoff *et al.*, 1988, *J. Infect. Dis.* 160:5028-5030; MacDonald *et al.*, 1998, *JAMA* 280:1685-1689; MacDonald *et al.*, 2000, *JAMA* 283:1826-1827). Para circunvenir estas propiedades inmunológicas, los polisacáridos de los serogrupos A y C se han acoplado covalentemente a

vehículos de proteína para hacer vacunas "conjugadas". En contraste a vacunas de polisacárido pleno, estas vacunas conjugadas son altamente inmunogénicas en infantes, en la re-inyección producen incrementos bioestables en concentraciones de anticuerpo anticapsular de suero, y preparar la habilidad para generar respuestas del anticuerpo de memoria a una inyección subsecuente de polisacárido pleno (Campagne *et al.*, *Pediat. Infect. Dis. J.* 19:144-150); MacLennan *et al.*, 2000, *JAMA* 283: 2795-2801). Las vacunas conjugadas con propiedades similares han sido ligeramente eficaces para prevenir enfermedades invasivas causadas por otras bacterias encapsuladas, tales como *Haemophilus influenzae* tipo b o *Streptococcus pneumoniae*.

El polisacárido capsular (PS) de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B es un inmunogen deficiente en humanos (Wyle *et al.*, 1972, *J. Infect. Dis.* 126:514-522; Zollinger, *et al.*, 1979; *J. Clin. Invest.* 63:836-834; Jennings *et al.*, 1981, *J. Immunol.* 127:104-108). Los intentos adicionales para mejorar la inmunogenicidad del polisacárido a través de la conjugación a proteína no han sido exitosos (Jennings *et al.*, 1981, *J. Immunol.* 127:104-108). Para aumentar la inmunogenicidad, el polisacárido de cápsula de serogrupo B meningococal (MenB PS) se ha modificado químicamente (grupo N-propionilado se substituye por el grupo N-acetilo de polisacárido B) y se acopla covalentemente a un conjugado de vehículo de proteína (proteína PB N-Pr-MenB). La vacuna induce en ratones concentraciones elevadas de anticuerpos IgG que son bactericidas y protectores (este concepto se describe y reivindica en la Patente de E.U. No. 4,727,136, emitida el 23 de Febrero de 1988 para Jennings *et al.*,). Esta vacuna también es inmunogénica en primates sub-humanos, induciendo anticuerpos de suero que activan la bacteriolisis medida por completo (Fusco *et al.*, 1997, *J. Infect. Dis.* 175:364-372). En humanos, tales anticuerpos se conocen por conferir protección contra el

desarrollo de enfermedad meningococal (Goldschneider *et al.*, 1969, *J. Exp. Med.* 129:1307). Sin embargo, un subconjunto de los anticuerpos inducidos por esta vacuna tiene actividad auto-anticuerpo a MenB PS sin modificar (es decir, N-acetil-MenB PS), Granoff *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 160:5028-5036, que
5 origina serias preocupaciones de seguridad acerca del uso de esta vacuna en humanos. Por lo tanto, los investigadores han pensado los planteamientos alternativos para desarrollar una vacuna eficaz y segura para la prevención de la enfermedad causada por cepas de serogrupo B.

Otros grupos se han enfocado en proteínas de superficie como
10 vacunas. Por ejemplo, el componente de proteína principal del pelo, pilin, produce una respuesta inmune; sin embargo, muchas variantes antigénicas existen y continúan desarrollándose, que las vacunas contra la proteína pilosa no han sido altamente eficaces. Ver, Patente de E.U. No. 5,597,572. En otros ejemplos, las vacunas se han enfocado ha proteína A de superficie *Neisseria*
15 altamente conservada (NspA) (ver, por ejemplo, Publicación de PCT No. WO96/29412). Aunque el gen se conserva altamente y expresa en virtualmente todas las cepas, ambos anticuerpos, policlonal y monoclonal, preparados contra NspA recombinante son bactericidas y/o proporcionan protección, contra solamente aproximadamente 50% de cepas genéticamente diversas (Moe *et al.*,
20 (1999 *Infect. Immun.* 67:5664; Moe *et al.*, *Infect. Immun.* 2001 69:3762). Estas observaciones sugieren que NspA recombinante solo no proporcionará protección adecuada contra un espectro amplio de cepas *Neisseria*.

Aún otros grupos han utilizado preparaciones de membrana para inducir inmunidad. En general, los intentos para producir una vacuna B
25 meningococal en base a las vesículas de membrana exterior utilizaron inmunizaciones repetidas con material preparado de una cepa única o inmunización repetida con una vacuna que contiene antígenos de vesícula de

múltiples cepas. Cuando la vacuna contuvo antígenos de vesícula de más de una cepa, las concentraciones del anticuerpo bactericidal resultantes de infantes o niños dieron dos o tres dosis inferiores (Cartwright K *et al.*, 1999, *Vaccine*; 17:2612-2619; de Kleinjn ED *et al.*, 2000, *Vaccine*, 18:1456-1466). En
5 estos estudios, y en un estudio hecho en monos *cinomolgus* (Rouupe van der Voort ER, 2000, *Vaccine*, 18:1334-1343) existe también evidencia de interferencia inmune entre las respuestas al antígeno diferente. Cuando se utiliza inmunización repetida con vesículas de una cepa única, las concentraciones de anticuerpo más elevadas pero el espectro de reactividad de
10 anticuerpo se limita a solamente unas pocas cepas que tienden a ser serológicamente similares entre sí (Tappero *et al.*, 1999, *JAMA* 281:1520; y Rouupe van der Voort ER, 2000, *Vaccine*, 18:1334-1343). Nuestros experimentos en modelos animales de laboratorio, que se describen abajo confirmaron esta última observación. Los antisueros de animales de control
15 dan dos inmunizaciones secuenciales de una vacuna de vesícula de membrana exterior preparada en el National Institute of Public Health, Oslo, Noruega, de una cepa de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* único, H44/76 (B:15:P1.7,16; "Vacuna Noruega", reaccionadas por citometría de flujo y fueron bactericidas contra solamente las cepas de subgrupo B que como lo fueron del
20 mismo serosubtipo (es decir, P1.7,16) o cepas que tienen un epítipo similar al epítipo P1.16 (tal como cepas P1.10-4).

Los humanos son el único receptor conocido de *Neisseria meningitidis* spp. De acuerdo con lo anterior, las especies de *Neisseria* han incluido una amplia variedad de estrategias altamente eficaces para evadir el
25 sistema inmune humano. Estas incluyen la expresión de una cápsula de polisacárido que es cruzadamente reactiva con el ácido polisialico huésped (es decir, serogrupo B) y mutabilidad antigénica elevada para los epítopos no

capsulares inmunodominantes, es decir, epítomos de antígenos que están presentes en la superficie en cantidades relativamente grandes, son accesibles a anticuerpos, y producen una respuesta fuerte del anticuerpo.

Los esfuerzos anteriores para desarrollar vacunas de espectro
5 amplio se han dificultado por la amplia variedad de estrategias altamente eficaces utilizadas por especies de *Neisseria* para evadir el sistema inmune humano. Debido a estos antígenos, una respuesta inmune a una cepa dada con frecuencia no conferirá inmunidad eficaz contra otras cepas de *Neisseria*. La presente invención supera las desventajas de los planteamientos de la técnica
10 anterior a vacunación y produce inmunidad protectora contra un amplio espectro de cepas de *Neisseria meningitidis*, notablemente (pero no exclusivamente) incluyendo cepas que pertenecen al serogrupo B.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 La presente invención generalmente proporciona métodos y vacunas para la prevención de enfermedades causadas por bacteria *Neisseria meningitidis*, particularmente cepas de serogrupo B.

En una modalidad, el método de la invención comprende:
administrar a un mamífero una primer preparación de i) vesículas de membrana
20 exterior (OMV) de una primer *Neisseria meningitidis* spp., y ii) microvesículas (MV) liberadas en un medio de cultivo durante el cultivo de un primer *Neisseria meningitidis* spp., dicha administración de OMV y/o MV siendo en una cantidad suficiente para preparar y/o producir inmunológicamente una respuesta inmune a epítomos presentes en dicha primer preparación; administrar al menos una
25 segunda preparación de i) OMVs de una segunda *Neisseria meningitidis* spp., y/o ii) MVs liberadas en un medio de cultivo durante el cultivo de un segundo *Neisseria meningitidis* spp., dicha administración de OMV y/o MV siendo en una

cantidad suficiente para preparar y/o producir inmunológicamente una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha segunda preparación; y opcionalmente, pero preferentemente, administrar una tercer preparación de i) OMV de una tercer *Neisseria meningitidis* spp., y/o ii) MV que se liberan en un medio de cultivo durante el cultivo de una tercer *Neisseria meningitidis* spp., dicha administración de OMV y/o MV siendo en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha tercer preparación. La administración de la primer, segunda y (opcionalmente) tercer preparación resulta en la inducción de una respuesta inmune a epítopos presentes en la preparaciones, en donde dicha respuesta confiere inmunidad protectora contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis* spp.

En modalidades preferidas, la primer, segunda y tercer cepa de *Neisseria* son genéticamente diversas entre sí, por ejemplo, la primer cepa es genéticamente diversa a la segunda cepa, la tercer cepa, o ambas, la segunda y tercer cepa.

En modalidades relacionadas, la administración de las preparaciones es serial. La administración serial de las preparaciones puede conducirse en cualquier orden. Por ejemplo, los siguientes ordenes de administración se encuentran dentro del alcance de la invención (de izquierda a derecha, con la tercer administración siendo opcional): OMV-OMV-OMV; OMV-OMV-MV; OMV-MV-MV; MV-MV-MV; MV-MV-OMV; MV-OMV-OMV; OMV-MV-OMV; y MV-OMV-MV. Preferentemente, el orden de administración es MV-MV-OMV.

En otras modalidades relacionadas, las preparaciones se administran como una mezcla, en donde la administración inicial de la mezcla puede seguirse por una a o más administraciones adicionales de la misma o diferente mezcla para servir como inyecciones de refuerzo.

En una modalidad específica, la invención incluye administrar serialmente microvesículas (MV) que forma burbujas naturalmente durante el crecimiento de *Neisseria meningitidis* y se liberan en el medio de cultivo (recolectado al separar las células más grandes de las burbujas más pequeñas y después forman en tabletas las burbujas) y/o vesículas de membrana exterior (OMV, preparada directamente de fracciones de membrana exterior aisladas). OMVs y MVs se prepara de cepas "genéticamente diversas" de *Neisseria meningitidis*, por ejemplo, cepas que difieren de otra en al menos una de serotipo y serosubtipo, y pueden ser diversas en múltiples lugares genéticos, por ejemplo, difieren en tanto serotipo como serosubtipo, por ejemplo, teniendo diferentes proteínas Porin, PorA y PorB de membrana exterior. Además, las preparaciones de OMV y/o MV pueden darse secuencialmente en al menos dos, preferentemente al menos tres administraciones (por ejemplo, inyecciones) de OMVs o MVs de cepas genéticamente diversas; cuatro, cinco, seis o más administraciones también se contemplan.

En otra modalidad específica, la primer *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un segundo serosubtipo, tal segundo subserotipo es diferente del subserotipo de la primer *Neisseria meningitidis* spp, y, cuando se utiliza, la tercer *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un tercer serosubtipo, tal tercer serosubtipo es diferente del subserotipo de al menos la primer, y preferentemente ambas, primera y segunda, *Neisseria meningitidis* spp.

En todavía otra modalidad específica, la primer *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un primer serotipo y de un primer serosubtipo; la segunda *Neisseria meningitidis* spp. es un miembro de un segundo serotipo y de un segundo serosubtipo, tal segundo serotipo y segundo subserotipo son diferentes del serotipo y subserotipo de la primer *Neisseria meningitidis* spp, y, cuando se utiliza, la tercer *Neisseria meningitidis* spp. es

un miembro de un tercer serotipo y de un tercer serosubtipo, tal tercer serotipo y tercer subserotipo son diferentes del serotipo y subserotipo de al menos la primer, y preferentemente ambas, primer y segunda, *Neisseria meningitidis* spp.

En una modalidad específica de la invención, una primer
5 administración es con microvesículas (MVs) preparadas de una cepa de serogrupo C (por ejemplo, RM1090 (C:2a:P1.5,2:L3,7)). La segunda administración es con MVs preparadas de una segunda cepa (por ejemplo, BZ198 (B:NT:P1.4)), y la tercer administración es con vesículas de membrana exterior (OMVs) preparadas de una tercer cepa (por ejemplo, Z1092
10 (A:4,21:P1.10)). La inmunización secuencial con vesículas y/o microvesículas preparadas de cepas de *Neisseria meningitidis* genéticamente diversas se refiere de aquí en adelante como la "vacuna CHORI" o "antígeno CHORI". La inmunización con una mezcla de la primer, segunda y tercer preparación de la vacuna CHOR se refiere como "mezcla CHORI".

15 En otros aspectos, la invención comprende una composición que contiene una primer preparación seleccionada del grupo que consiste de vesícula de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas OMV y MV de una primer especie de *Neisseria meningitidis*; una segunda preparación seleccionada del grupo que consiste de vesícula de membrana exterior (OMV),
20 microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV, de una segunda especie de *Neisseria meningitidis*, en donde la segunda *Neisseria meningitidis* es genéticamente diversa a la primer especie de *Neisseria meningitidis*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En modalidades relacionadas, la composición comprende además
25 una tercer preparación seleccionada del grupo que consiste de vesícula de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV de una tercer especie de *Neisseria meningitidis*, en donde la tercer especie de

Neisseria meningitidis es genéticamente diversa de la primer especie de *Neisseria meningitidis*. En modalidades específicas, la primer preparación de la composición comprende MV, la segunda preparación comprende MV; y la tercer preparación comprende OMV. Preferentemente, la primer y segunda especie de *Neisseria meningitidis* son genéticamente diversas en que difieren en al menos uno de serotipo o serosubtipo, y, en donde incluídas, la tercer y la primer especie de *Neisseria meningitidis* son genéticamente diversas en que difieren en al menos uno de serotipo o serosubtipo.

En todavía otros aspectos, la invención comprende una composición que contiene al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, el antígeno aislado presentándose en la composición en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune en un huésped mamífero, y caracterizándose como una proteína inmunoprecipitada con anti-suero producido después de la vacunación con la vacuna CHORI, y teniendo una masa molecular aparente seleccionada del grupo que consiste de aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 59.5 kDa, aproximadamente 40.7 kDa, aproximadamente 39.6 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 27.9 kDa, y 14.5 kDa; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención comprende una composición que contiene al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, el antígeno aislado estando presente en la composición en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune en un huésped mamífero, y caracterizándose como una proteína detectada por Western blot con anti-suero producido después de la vacunación de un mamífero con la vacuna CHORI, y teniendo una masa molecular aparente seleccionada del grupo que consiste de aproximadamente 53 kDa a 57 kDa; aproximadamente 46-47 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 20 kDa a 21 kDa; y

aproximadamente 18 kDa; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención comprende una composición que contiene al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, el antígeno aislado estando presente en la composición en una cantidad eficaz para
5 producir una respuesta inmune en un huésped mamífero, en donde el antígeno es de una proteína que se une específicamente a un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste de 1D9, 4B11, 9B8 y 14C7 (tales anticuerpos se describen en la presente y depositan con ATCC); y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En modalidades preferidas, las composiciones que tienen antígenos aislados comprenden al menos dos antígenos de *Neisseria meningitidis* aislados.

En aspectos relacionados, la invención comprende métodos para producir inmunidad protectora de espectro amplio contra una enfermedad
15 causada por una especie de *Neisseria meningitidis*, dicho método comprendiendo administrar a un mamífero al menos una de las composiciones que comprenden antígenos aislados como se describe arriba.

Preferentemente, las composiciones de antígeno (por ejemplo, preparaciones OMV/MV, preparaciones de proteína aisladas) pueden
20 administrarse a mamíferos, especialmente humanos, que son inmunológicamente inocentes con respecto a *Neisseria meningitidis* (es decir, no se han expuesto a antígenos de *Neisseria meningitidis*, o no se han expuesto a cantidades insuficientes para producir una respuesta inmune protectora). Una modalidad específica de la invención incluye la administración
25 a infantes humanos que son de aproximadamente cinco años o más pequeños, especialmente dos años o más pequeños.

En algunas modalidades de la invención, antes de la administración

de las composiciones de antígeno de *Neisseria meningitidis*, los individuos que se han preparado por exposición (a través de la administración o infección natural) a una especie *Neisseria* diferente a *Neisseria meningitidis* (o una composición de antígeno preparada de una especie *Neisseria*).

5 Los antisueros obtenidos de ratones inmunizados como se describe arriba se unen a la superficie celular bacteriana de un grupo de cepas de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* genéticamente diversas, como se determina por la detección citométrica de flujo de inmunofluorescencia indirecta. En un ejemplo, los sueros de ratones inmunizados fueron positivos
10 para once de 12 cepas probadas. Estas 11 incluyen 3 cepas meningococales B con proteínas PorA y PorB respectivas que fueron heterólogas a aquellas de las cepas meningococales utilizadas para preparar los Inmunogenes utilizados para la vacunación. (A manera de contraste, los antisueros de animales inmunizados con dos inyecciones de la "vacuna OMV Noruega" arriba descrita
15 se reaccionan por citometría de flujo con solamente 5 de 11 cepas. Todas las 5 tuvieron proteínas PorA y/o PorB que fueron las mismas o cercanamente relacionadas a aquellas en la vacuna OMV "Noruega"). Los antisueros de animales inmunizados con la "vacuna CHORI" también produjeron bacteriolisis mediada por complemento en 11 de 12 cepas, un buen predictor de una
20 protección contra la enfermedad en humanos (Goldschneider *et al.*, 1969, J. Exp. Med. 129:1307). El anticuerpo que se une a la superficie de la célula bacteriana, o bacteriolisis mediada por complemento, no se inhibe por la presencia de polisacárido de serogrupo B soluble en exceso, evidencia de que los anticuerpos protectores se dirigen contra antígenos no capsulares.

25 Los antisueros de ratones inmunizados en un segundo ejemplo utilizando la vacuna CHORI son bactericidas contra 14 de 14 cepas probadas incluyendo ocho cepas con serosubtipos que son heterólogos de aquellos

utilizados en las preparaciones de vacuna. En un tercer ejemplo, los antisueros preparados de conejillos de Indias inmunizados con la vacuna CHORI son bactericidas contra 9 de 10 cepas probadas incluyendo 5 cepas con serosubtipos que son heterólogos a aquellos expresados por las cepas de vacuna. Los antisueros a la vacuna CHORI preparados en ratones en el primer ejemplo y en conejillos de Indias en el tercer ejemplos también son altamente protectores contra bacteremia en las ratas infantas preparadas con bacteria de serogrupo B. El procedimiento de inmunización utilizado en la presente generalmente induce el sistema inmune para converger en antígenos no capsulares que son comunes a las cepas de las cuales se obtienen MVs y OMVs. La vacuna CHORI produce anticuerpos contra múltiples epítomos de superficie celular incluyendo, PorA, posiblemente PorB, y proteínas conservadas tales como proteína de superficie *Neisseria* A (NspA), la proteína clase 4, (proteína modificable por reducción, Rmp) y otros antígenos no capsulares aún sin identificar.

En general, las vacunas de la presente invención que emplean inmunización secuencial con material antigénico preparado de diferentes cepas (genéticamente diversas) tienen el potencial para conferir protección contra la mayoría de cepas de serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. Este planteamiento también tiene amplia aplicabilidad para vacunación contra cepas de *Neisseria meningitidis* representativas de otros serogrupos tales como A, C, Y o W-135, y también contra otros miembros del género *Neisseria*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 resume los resultados de las pruebas de eficacia de la vacuna de la vesícula de membrana exterior meningococal.

La figura 2 es una fotografía de un gel de 15% SDS-PAGE de

microvesícula (MV), microvesícula extraída con deoxicolato (DOC MV), vesícula de membrana exterior (OMV), y preparaciones de vacuna de vesícula de membrana exterior extraída con deoxicolato (DOC OMV) de cepas meningococales Z1092 (A:4,21:P1.10), BZ198 (B:NT:P.1.4), y RM1090 (C:2a:P1.2), respectivamente. Vía 1, estándares de masa molecular. Vía 2, Z1092 MV. Vía 3, Z1092 DOC MV. Vía 4, Z1092 OMV. Vía 5, Z1092 DOC OMV. Vía 6, BZ198 MV. Vía 7, BZ198 DOC MV. Vía 8, BZ198 OMV. Vía 9, BZ198 DOC OMV. Vía 10, RM1090 MV. Vía 11, RM1090 DOC MV. Vía 12, RM1090 OMV. Vía 13, RM1090 DOC OMV.

La Figura 3 es una serie de gráficas que muestran la unión de vacuna anti-CHORI, vacuna anti-Noruega y antisueros de control y mAb para cepas meningococales B encapsuladas vivas MC58 (B:15:P1.7, 16) y S3446 (B:19,14:P1.23,14), como se determina por citometría de flujo de fluorescencia indirecta. Todos los antisueros se prueban en diluciones de 1:20. mAb de control es un mAb de murino específico de la anti-cápsula (Granoff *et al.*, 1998, *J. immunol.* 160:5028-5036). Los antisueros de control fueron sueros agrupados de ratones inmunizados con proteínas del cultivo sobrenadante de BL21 de la cepa de *E. coli* o conejillos de Indias inmunizados con el adyuvante, hidróxido de aluminio, sólo. Observe que la cepa MC58 tiene el mismo serotipo y serosubtipo como la cepa utilizada para preparar OMV para la vacuna Noruega. El serotipo y serosubtipo como la cepa utilizada para preparar OMV para la vacuna Noruega. El serotipo y serosubtipo de la cepa S3446 es heteróloga a las cepas utilizadas para preparar ambas vacunas.

La Figura 4 presenta datos que consideran la unión de la superficie celular bacteriana de antisueros determinados por citometría de flujo de fluorescencia indirecta.

La Figura 5 presenta datos que ilustran la reactividad de antisueros

CHORI contra cepas de serogrupo A y C de *N. meningitidis*.

La Figura 6 resume los resultados de un análisis bactericida que prueba los antisueros de vacuna anti-CHORI, anti-rNspA, y vacuna anti-Noruega contra cepa meningococal B 2996.

5 La Figura 7 proporciona datos que muestran la actividad bactericida mediada por complemento de antisueros y anticuerpos.

La Figura 8 proporciona datos que muestran la actividad bactericida mediada por complemento de antisueros de ratones inmunizados con las vacunas indicadas.

10 La Figura 9 proporciona datos que muestran la actividad bactericida de antisueros de conejillos de Indias inmunizados con las vacunas indicadas.

La Figura 10 proporciona datos que muestran la protección pasiva en ratas infantas contra la bacteremia de la cepa meningococal B 8047 por
15 antisueros y anticuerpos.

La figura 11 proporciona datos que muestran la protección pasiva en ratas infantas contra bacteremia de la cepa meningococal B 8047 por antisueros de conejillos de Indias.

La figura 12 es una fotografía de un gel de plata coloreada de 15%
20 SDS-PAGE de proteínas expuestas a superficie precipitadas por antisueros del antígeno anti-CHORI de cepa meningococal B M7. Vía 1, proteína total de M7. Vía 2, proteínas precipitadas por antisuero anti-CHORI de murino. Vía 3, proteínas precipitadas por antisueros de control negativo de murino. Los números a la izquierda de la figura indican masa molecular aparente en kDa.

25 La Figura 13 es una fotografía de una Western blot de un gel de 15% SDS-PAGE de proteínas expuestas a superficie precipitadas por antisueros de antígeno anti-CHORI de cepa meningococal B M7 no encapsulada. Vías 1 y

4, proteína total de M7. Vías 2 y 5, proteínas precipitadas por antisueros de antígeno anti-CHORI de murino. Vías 3 y 6, proteínas precipitadas por antisueros de control negativo de murino. Antisueros de antígeno anti-CHORI se utilizan como el anticuerpo de detección primario en vías 1 a 3 y
5 MN16C13F4 mAb anti-PorA (Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu, Biltoven, Países Bajos) que es específico para serosubtipo P1.2 se utiliza como el anticuerpo de detección primaria en vías 4 a 5.

La Figura 14 proporciona datos que muestran las proteínas accesibles de superficie bacteriana precipitadas por antisueros agrupados de
10 ratones secuencialmente inmunizados con MV de cepa MenC RM1090, MV de cepa MenB BZ198, y OMV de cepa MenA Z1092.

La Figura 14A proporciona ejemplos adicionales de datos que muestran las proteínas accesibles de superficie bacteriana precipitadas por antisueros agrupados de ratones secuencialmente inmunizados con MV de cepa
15 MenC RM1090, MV de cepa MenB BZ198, y OMV de cepa MenA Z1092.

La figura 15 es una fotografía de una Western blot de un gel de 15% SDS-PAGE de preparaciones MV u OMV. Los antisueros de detección primarios son antisueros de vacuna anti-CHORI/CFA de ratón agrupados en vías 1 a 3, anti-CHORI/Al₂(OPO₃)₃ de ratón agrupado en vías 4 y 5, y anti-
20 CHORI//Al₂(OPO₃)₃ de conejillos de Indias en vías 6 a 8. Vías 1 y 6, proteínas MV preparadas de cepa RM1090. Vías 2, 7 y 7, proteínas MV preparadas de cepa BZ198. Vías 3, 5 y 8, proteínas OMV preparadas de cepa Z1092. Los números a la izquierda de la figura indican masa molecular aparente en kDa.

La Figura 16 proporciona datos que muestran las masas
25 moleculares aparentes de proteínas de las preparaciones de OMV o MV indicadas que son reactivas con antisueros de ratones y conejillos de Indias que se inmunizan secuencialmente con MV de cepa MenC RM1090 y cepa MenB

Bz198, y OMV de cepa MenA Z1092.

La Figura 17 proporciona datos de ELISA que muestran la absorción de anticuerpos anti-LOS de antisueros agrupados obtenidos de ratones y conejillos de Indias secuencialmente inmunizados con MV de cepa MenC RM1090 y cepa MenB BZ198, y OMV de cepa MenA Z1090, o tres inyecciones de una mezcla de tres preparaciones de vesícula.

La Figura 18 proporciona datos de análisis bactericidas mediado por complemento que muestra que la absorción de anticuerpos anti-LOS de antisueros agrupados obtenidos de ratones y conejillos de Indias secuencialmente inmunizados con MV de cepa MenC RM1090 y cepa MenB BZ198 y OMV de cepa MenA Z1092, o tres inyecciones de una mezcla de tres preparaciones de vesícula no cambian la actividad bactericida de los antisueros contra cepas MenB que son homólogas o heterólogas a las cepas de vacuna.

La Figura 19 proporciona datos de una ELISA de célula completa que muestra ejemplos de mAbs producidas de ratones secuencialmente inmunizados con MV de cepa MecC RM1090 y cepa MenB BZ198 y OMV de cepa MenA Z1092. Varias mAbs son reactivas con todas las cepas meningococales probadas y otras reaccionan con un subconjunto de cepas limitado.

La Figura 20 resume la actividad bactericida mediada por complemento de mAbs preparadas de ratones inmunizados con antígeno anti-CHORI y probadas contra varias cepas MenB.

La Figura 21 resume el serotipo meningococal y serosubtipo que define anticuerpos monoclonales disponibles de RIVM.

La Figura 22 resume el serogrupo, serotipo, y serosubtipo que define anticuerpos monoclonales disponibles de NIBSC.

Antes de que la presente invención y modalidades ejemplificativas

específicas de la invención se describan, debe entenderse que esta invención no se limita a modalidades particulares descritas, como tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente es para el propósito de describir solamente modalidades particulares, y no se propone ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solamente por las reivindicaciones anexas.

10 Cuando se proporciona un rango de valores, debe entenderse que cada valor que interviene, al décimo de la unidad del límite inferior al menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior del rango y cualquier otro valor que interviene o establecido en que el rango establecido se comprende dentro de la invención. Los límites, superior e inferior, de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños y también pueden comprenderse dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos de los límites, 15 los rangos que excluyen cualquiera de ambos de estos límites también se incluyen en la invención.

Al menos que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por cualquiera de experiencia ordinaria en la materia a la cual pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente también puede utilizarse en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan para referencia para describir y exponer los métodos y/o materiales 25 en conexión con las publicaciones que se citan.

Debe observarse que como se utiliza en la presente y en las

reivindicaciones anexas, las formas singulares "un(a)", "y" y "el(la)" incluyen referencias plurales al menos que el contexto dicte claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una pluralidad de tales antígenos y referencia a "la vesícula" incluye referencia a una o más
5 vesículas y equivalentes de las mismas conocidas por aquellos expertos en la materia, y así sucesivamente.

Las publicaciones tratadas en la presente se proporcionan solamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente debe construirse como una admisión de que la
10 presente invención no se titula para preceder tal publicación en virtud de la técnica anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación actuales que pueden necesitarse que se confirmen independientemente.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La inmunización de infantes, niños más grandes y adultos con vacunas de vesícula de membrana exterior meningococal (OMV) induce anticuerpos bactericidas de suero, un correlación serológica de protección contra enfermedad (Goldschneider *et al.*, 1969, J. Exp. Med. 129:1307). La
20 eficacia de las vacunas OMV para la prevención de enfermedad meningococal B también se ha demostrado directamente en niños más grandes y adultos en pruebas clínicas prospecto, aleatorizadas, y en estudios de control de caso retrospectivo. Ver, por ejemplo, resultados resumidos en la sección de antecedentes y en la Figura 1. De esta manera, la efectividad clínica de las
25 vacunas de vesícula de membrana exterior no está en disputa. Tales vacuna son próximas a la licencia para su uso en Noruega en niños más grandes y adultos, y se encuentran en la última etapa de desarrollo clínico para su

licencia en otros países Europeos. Una vacuna OMV preparada por el Instituto Finley en Cuba también se encuentra disponible comercialmente y se ha dado a millones de niños en Sudamérica.

La respuesta del anticuerpo bactericida de suero a vacunas OMV
5 tiende a ser específica de cepa (Tappero *et al.*, 1999, *JAMA* 281:1520; y Roupe van der Voort ER, 2000, *Vaccine*, 18:1334-1343). PorA es inmunodominante, y la inmunidad inducida es predominantemente específica a las cepas de las cuales las vesículas de membrana se obtienen (Tappero *et al.*, 1999, *JAMA* 281:1520; Martin SL *et al.*, 2000, *Vaccine*, 18:2476-2481). Esta limitación se
10 debe principalmente a la variabilidad antigénica de la proteína PorA y es particularmente real en infantes quienes son inmunológicamente inocentes (Tappero *et al.*) con respecto a la exposición anterior a antígenos neisserial.

Por lo tanto, la presente invención incluye producir una respuesta inmune que es ampliamente reactiva con diversas cepas de *N. meningitidis* que
15 producen la enfermedad. La invención rodea el problema de inmunodominio de dominios antigénicamente variables de PorA en vacunas a base de PorA o vesícula al enfocar la respuesta del anticuerpo en antígenos comunes en las cepas de vacuna. De manera importante, los métodos de la invención producen anticuerpo bactericida de suero, el único serológico probado que correlaciona la
20 protección en humanos (Goldschneider *et al.*, 1969, *supra*), contra cepas de *Neisseria* que expresan epitopos de serosubtipo que no se utilizan en las preparaciones de vacuna. Además, el método produce anticuerpo bactericida de suero contra cepas que no se mueren por el anticuerpo a una proteína conservada tal como proteína A de superficie Neisserial, una vacuna
25 meningococal candidato (Martin *et al.*, 2000. *J. Biotechnol.* 83:27-31; Moe *et al.*, (1999 *Infect. Immun.* 67:5664; Moe *et al.*, *Infect Immun.* 2001 69:3762). Sin sujetarse a teoría, la vacuna y régimen de inmunización de la invención

proporciona sus ventajas inesperadas en inmunidad protectora de espectro amplio al producir anticuerpos que son específicos tanto para antígenos no conservados como conservados.

A. Definiciones

5 El término "inmunidad protectora" significa que una vacuna o programa de inmunización que se administra a un mamífero induce una respuesta inmune que evita, retarda el desarrollo de, o reduce la severidad de una enfermedad que se causa por *Neisseria meningitidis*, o disminuye o elimina completamente los síntomas de la enfermedad.

10 La frase "una enfermedad causada por una cepa de serogrupo B de *Neisseria meningitidis*" comprende cualquier síntoma clínico o combinación de síntomas clínicos que están presentes en una infección con un miembro de serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. Estos síntomas incluyen pero no se limitan a: colonización del tracto respiratorio superior (por ejemplo, mucosa de
15 la nasofaringe y amígdalas) por una cepa patogénica de serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, penetración de las bacterias en la mucosa y el lecho vascular submucosal, septicemia, ataque séptico, inflamación, lesiones de la piel hemorrágicas, activación de fibrinólisis y de coagulación sanguínea, disfunción del órgano tal como riñón, pulmón, y falla cardíaca, hemorragia
20 adrenal e infarto muscular, derrame capilar, edema isquemia del limbo periférico, síndrome del distrés respiratorio, pericarditis y meningitis.

La frase "inmunidad protectora de espectro amplio" significa que una vacuna o programa de inmunización produce "inmunidad protectora" contra al menos uno o más (o contra al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al
25 menos cinco, contra al menos ocho, o al menos contra más de ocho) cepas de *Neisseria meningitidis*, en donde cada una de las cepas pertenece a un serosubtipo diferente que las cepas utilizadas para preparar la vacuna. La

invención contempla específicamente y comprende una vacuna o régimen de vacunación que confiere protección contra una enfermedad causada por un miembro de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* y también contra serogrupos, particularmente serogrupos A, C, Y y W-135.

5 La frase "se une específicamente a un anticuerpo" o "específicamente inmunoreactivo con", cuando se refiere a un antígeno tal como un polisacárido, fosfolípido, proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que se basa en y/o es prueba de la presencia del antígeno en una muestra que también puede incluir una población heterogénea de otras
10 moléculas. De esta manera, bajo condiciones de inmunoanálisis designadas, el anticuerpo específico o anticuerpos se une(n) a un antígeno particular o antígenos en una muestra y no se unen en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo o antisuero que se selecciona
15 por su especificidad para un antígeno o antígenos particulares.

La frase "en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha preparación" significa que existe una diferencia detectable entre un indicador de respuesta inmune medido antes y después de la administración de una preparación de antígeno particular. Los
20 indicadores de respuesta inmune incluyen pero no se limitan a: especificidad o concentración de anticuerpo, como se detecta por un análisis tal como un inmunoanálisis enlazado a enzima (ELISA), análisis bactericida, citometría de flujo, inmunoprecipitación, inmunodifusión Outcher-Lowny; análisis de detección de unión de, por ejemplo, mancha, Western blot o conjuntos de antígenos;
25 análisis de citotoxicidad, etc.

Un "antígeno de superficie" es un antígeno que está presente en una estructura de superficie de *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, la

membrana exterior, membrana interior, espacio periplásmico, cápsula, pelos, etc.).

La frase "genéticamente diversa" como se utiliza en el contexto de cepas genéticamente diversas de *Neisseria meningitidis*, se refiere a cepas que difieren entre sí en la secuencia de aminoácidos de al menos uno, y usualmente al menos dos, más usualmente al menos tres polipéptidos, particularmente polipéptidos antigénicos. La diversidad genética de cepas puede realizarse al seleccionar cepas que difieren en al menos uno o más, preferentemente al menos dos o más, de serogrupo, serotipo, o serosubtipo (por ejemplo, dos cepas que difieren en al menos una de las proteínas seleccionadas de membrana exterior, proteínas PorA y PorB, a decir son genéticamente diversas una respecto a la otra). La diversidad genética también puede definirse por, por ejemplo, tipificación de secuencia de múltiples lugares y/o tipificación de enzima de múltiples lugares (ver, por ejemplo, Maiden *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140; Pizza *et al.*, 2000 *Science* 287:1816), electroforesis de enzima de múltiples lugares, y otros métodos conocidos en la materia.

"Serogrupo" como se utiliza en la presente se refiere a la clasificación de *Neisseria meningitidis* en virtud de variaciones inmunológicamente detectables en el polisacárido capsular. Aproximadamente 12 serogrupos son conocidos: A, B, C, X, Y, Z, 29-E, W-135, H, I, K y L. Cualquier serogrupo puede comprender múltiples serotipos y múltiples serosubtipos.

"Serotipo" como se utiliza en la presente se refiere a la clasificación de cepas de *Neisseria meningitidis* en base a las diferencias antigénicas definidas por el anticuerpo monoclonal en la proteína de membrana exterior Porin B. Un serotipo único puede encontrarse en múltiples serogrupos y múltiples serosubtipos.

"Serosubtipo" como se utiliza en la presente se refiere a la clasificación de cepas de *Neisseria meningitidis* en base a las variaciones antigénicas definidas por el anticuerpo en una proteína de membrana exterior llamada Porin A, o en tipificación VR de secuencias de aminoácidos deducidas de secuenciación de ADN (Sacchi *et al.*, 2000, *J. Infect. Dis.* 182:1169, ver también el sitio web Multi Locus Sequence Typing). Más variabilidad entre proteínas PorA ocurre en dos (ondas I y IV) de ocho ondas expuestas a superficie, putativas. Las ondas variables I y IV se han designado VR1 y VR2, respectivamente. Un serosubtipo único puede encontrarse en múltiples serogrupos y múltiples serotipos.

"Enriquecido" significa que un antígeno en una composición de antígeno se manipula por un experimentador o un médico de manera que está presente en al menos una concentración tres veces mayor por peso total, preferentemente al menos una concentración 10 veces mayor, más preferentemente al menos una concentración 100 veces mayor, y más preferentemente al menos una concentración 1,000 veces mayor que la concentración de que el antígeno en la cepa de la cual la composición de antígeno se obtiene. De esta manera, si la concentración de un antígeno particular es 1 microgramo por gramo de preparación bacteriana total (o de proteína bacteriana total), una preparación enriquecida contendría al menos 3 microgramos por gramo de preparación bacteriana total (o de proteína bacteriana total).

El término "inmunológicamente inocente con respecto a *Neisseria meningitidis*" denota un individuo (por ejemplo, un mamífero tal como un paciente humano" que nunca se ha expuesto (a través de infección o administración" a *Neisseria meningitidis* o a una composición de antígeno derivada de *Neisseria meningitidis* en cantidades suficientes para producir

inmunidad protectora, o si se expone, falla en montar una respuesta inmune protectora. (Un ejemplo de lo último sería un individuo expuesto a una edad demasiado joven cuando las respuestas inmune protectoras no pueden ocurrir. Molages *et al.*, 1994, *Infect. Immun.* 62:4419-4424). Además es deseable (pero

5 no necesario) que el individuo no se ha expuesto a una especie de *Neisseria* diferente a *Neisseria meningitidis* (o una composición de antígeno preparada de una especie *Neisserial*), particularmente no a una cepa de reacción transversal de especies *Neisserial* (o al separar las células bacterianas del medio de cultivo (por ejemplo, por filtración o por una centrifugación de baja velocidad

10 que forma en bolitas las células, o lo similar), lisar las células (por ejemplo, por la adición de detergente, ataque osmótico, sonicación, cavitación, o lo similar) y separar una fracción de membrana exterior de moléculas citoplásmicas (por ejemplo, por filtración; o por precipitación diferencial o agregación de membranas exteriores y/o vesículas de membrana exterior, o por métodos de

15 separación de afinidad utilizando ligandos que reconocen específicamente moléculas de membrana exterior; o por una centrifugación de velocidad elevada que forma en bolitas las membranas exteriores y/o vesículas de membrana exterior, o lo similar); fracciones de membrana exterior pueden utilizarse para producir OMVs.

20 En la producción de MVs u OMVs, puede ser preferible para utilizar cepas que son productores relativamente bajos de endotoxina (lipopolisacárido, LPS) para reducir la necesidad de remover endotoxina de la preparación final antes de utilizarse en humanos. Por ejemplo, OMV y/o MV puede prepararse de mutantes de estas cepas de *Neisseria* en las cuales el lipooligosacárido u otros

25 antígenos que pueden ser indeseables en vacuna (por ejemplo, Rmp) se reduce o elimina.

Quando se desee (por ejemplo, en donde las cepas utilizadas para

producir MVs u OMVs se asocian con exotoxina o niveles elevados particulares de endotoxina), las MVs u OMVs se tratan opcionalmente para reducir endotoxina, por ejemplo, para reducir toxicidad después de la administración. La reducción de endotoxina puede realizarse por la extracción con un
5 detergente adecuado (por ejemplo, BRIJ-96, deoxicolato de sodio, lauoilsarcosinato de sodio, Empigen BB, Triton X-100, TWEEN 20 (polioxietileno de monolaurato de sorbitan), TWEEN 80, a una concentración de 0.1-10%, preferentemente 0.5-2%). Cuando se utiliza extracción de detergente, es preferible utilizar un detergente diferente a deoxicolato. La extracción de
10 preparaciones de OMV y MV con deoxicolato resultó en el retiro de algunos antígenos de proteína no capsular (ver Figura 2). Vacunación de animales con preparaciones de OMV o MV sujetas a extracción de deoxicolato produjo una respuesta inmune que se asocia con concentraciones inferiores de anticuerpos bactericidas en comparación con la vacunación con material extraído sin
15 deoxicolato.

Además de MVs u OMVs, los antígenos aislados o combinaciones particulares de antígenos pueden utilizarse para inducir una respuesta inmune protectora. La identidad de los antígenos aislados o combinaciones de antígenos se describen abajo.

20 Las composiciones inmunogénicas utilizadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno, así como también cualquier otro componente compatible, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie,
25 es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratarse, edad, el grupo taxonómico o individuo a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la

capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración del médico tratante de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caerá en un rango relativamente amplio que puede determinarse a través de pruebas de rutina. El tratamiento de dosis puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis (por ejemplo, incluyendo dosis de inyección de refuerzo). La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunoreguladores.

Las composiciones de antígeno o antígenos individuales a administrarse se proporcionan en una solución farmacéuticamente aceptable tal como una solución acuosa, con frecuencia una solución salina, o que puede proporcionarse en forma de polvo. Las composiciones también pueden incluir un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes adecuados conocidos que pueden utilizarse en humanos incluyen, pero no necesariamente se limitan a, alum, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, MF59 (4.3% p/v de escualeno, 0.5% p/v de Tween 80, 0.5% p/v de Span 85), ácido nucleico que contiene CpG (en donde la citosina no se metila), QS21, MPL, 3DMPL, extractos de Aquilla, ISCOMS, mutantes LT/CT, micropartículas poli(D,L-láctido-co-glucólido) (PLG), Quil A, interleuquinas, y lo similar. Para animales experimentales, uno puede utilizar Freund's, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referida como nor-MDO), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, referida como MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A de monofosforilo, dimicolato de trehalosa y estructura de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de 2% de escualeno/Tween 80. La efectividad de un adyuvante puede determinarse al medir la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el

antígeno inmunogénico.

Además, los adyuvantes ejemplificativos para aumentar la efectividad de la composición incluyen, pero no se limitan a: (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores

5 específicos tales como péptidos de muramilo (ver abajo) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59™ (WO 90/14837; Capítulo 10 en *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene 5% de Escualeno, 0.5% de Tween 80 y 0.5% de Span 85 (opcionalmente conteniendo MTP-PE) formulada

10 en partículas de submicron utilizando un microfluidizador, (b) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0.4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado plurónico L121, y thr-MDP ya sea microfluidizado en una emulsión de submicron o en vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula más larga, y (c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que

15 contiene 2% de Escualeno, 0.2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana tal como monofosfolípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y la estructura de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (2) adyuvantes de saponina, tales como QS21 o Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) puede utilizarse o partículas

20 generadas del mismo tales como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores), tales ISCOMS pueden estar exentos de detergente adicional, por ejemplo, WO 00/07621; (3) Adyuvante de Freund Completo (CFA) y Adyuvante de Freund Incompleto (IFA); (4) citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2-, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO 99/44636), etc.), interferones (por

25 ejemplo, interferón gamma), factor que estimula la colonia de macrófago (M-CSF), factor de necrosis de tumor (TNF), etc.; (5) lípido A de monofosforilo (MPL) o MPL de 3-O-deacilado (3dMPL), por ejemplo, GB-2220221, EP-A-

0689454, opcionalmente en la ausencia substancial de alum cuando se utiliza con sacáridos neumococales, por ejemplo, WO 00/56358; (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, por ejemplo, EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleótidos que

5 comprenden motivos CpG [Krieg *Vaccine* 2000, 19, 618-622; Krieg *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol*, 1998, 160, 870-876; Chu *et al.*, *J. Exp. Med*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, *Vaccine*, 1988, 16, 1216-

10 1224; Krieg *et al.*, *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, *J. Immunol*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, *J. Immunol*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, *Cell Immunol*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, *J. Immunol*, 1991, 147,

15 1759-1764; Yi *et al.*, *J. Immunol*, 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, *J. Immunol*, 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, *J. Immunol*, 1998, 160, 4755-4761; y Yi *et al.*, *J. Immunol*, 1998, 160, 5898-5906; solicitudes de patente internacional WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 y WO 98/52581] es decir, que contiene al menos un dinucleótido CG,

20 en donde la citosina no se metila; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo, WO 99/52549; (9) un surfactante de éster de sorbitan de polioxietileno en combinación con un octoxinol (WO 01/21207) o un surfactante de éster o éter de alquilo de polioxietileno en combinación con al menos un surfactante no iónico adicional tal como octoxinol (WO 01/21152),

25 (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) (WO 00/62800); (11) un inmunoestimulador y una partícula de sal metálica, por ejemplo, WO 00/23105; (12) una saponina y una emulsión

de aceite en agua, por ejemplo, WO 99/11241; (13) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3Dmpl + IM2 (opcionalmente + un estero), por ejemplo, WO 98/57859; (14) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para aumentar la eficacia de la composición. Los péptidos de muramilo incluyendo

5 N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-25 acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarninil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilarnina MTP-PE), etc.

Los antígenos pueden combinarse con excipientes convencionales,

10 tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sucrosa, magnesio, carbonato y lo similar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiere para aproximar condiciones fisiológicas tales como agentes reguladores y ajustadores de pH,

15 agentes ajustadores de toxicidad y lo similar, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y lo similar. La concentración de antígeno en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente en base a volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y lo similar de acuerdo con el modo particular de

20 administración seleccionado y las necesidades del paciente. Las composiciones resultantes pueden encontrarse en la forma de una solución, suspensión, tableta, píldora, cápsula, polvo, gel, crema, loción, pomada, aerosol y lo similar.

La concentración de antígenos inmunogénicos de la invención en

25 las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0.1%, usualmente en o al menos aproximadamente 2% a tanto como 20% a 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente por

volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

2. Inmunización

Las MVs, OMVs, antígenos aislados, o combinaciones de antígenos
5 de la presente invención se administran oralmente, nasalmente, nasofaringealmente, parenteralmente, entéricamente, gástricamente, tópicamente, transdérmicamente, subcutáneamente, intramuscularmente, en forma de tableta, sólida, en polvo, líquida, aerosol, localmente o sistémicamente, con o sin excipientes agregados. Los métodos actuales para
10 preparar composiciones parenteralmente administrables se conocerán o serán aparentes para aquellos expertos en la materia y se describen en más detalle en tales publicaciones como Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980). La administración de las MVs, OMVs, antígenos aislados, o combinaciones de antígenos puede
15 realizarse serialmente o como una mezcla, como se describe en más detalle abajo.

Se reconoce que los polipéptidos y compuestos relacionados descritos arriba, cuando se administran oralmente, deben protegerse de digestión. Esto se realiza típicamente ya sea formar un compuesto con la
20 proteína y la composición para volverlo resistente a hidrólisis enzimática o ácida o al empacar la proteína en un vehículo apropiadamente resistente tal como una liposoma. Medios para proteger proteínas de digestión son conocidos en la materia.

Con objeto de aumentar la vida media del suero, las preparaciones
25 antigénicas que se inyectan pueden también encapsularse, introducirse en el lumen de liposomas, prepararse como un coloide, u otras técnicas convencionales pueden emplearse que proporcionan una vida de suero

extendida de los péptidos. Una variedad de métodos se encuentran disponibles para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980), Patentes de E.U. Nos. 4,235,871, 4,501,728 y 4,837,028. Las preparaciones también pueden proporcionarse en
5 formas de liberación lenta o liberación controlada para la liberación y administración de las preparaciones de antígeno como una mezcla o modo serial.

Las composiciones se administran a un animal que se encuentra en riesgo de adquirir una enfermedad *Neisserial* para prevenir o al menos detener
10 parcialmente el desarrollo de enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para uso terapéutico dependerán, por ejemplo, de la composición del antígeno, la manera de administración, el peso y el estado general de salud del paciente, y el juicio del médico que prescribe. Las
15 dosis únicas o múltiples de las composiciones de antígeno pueden administrarse dependiendo de la dosis y frecuencia requerida y tolerada por el paciente, y vía de administración.

En modalidades particulares, las composiciones de antígeno descritas en la presente se administran serialmente. Primero, una dosis
20 terapéuticamente eficaz de una primer composición de antígeno (por ejemplo, MV, OMV, antígeno aislado, o combinaciones de antígenos, con o sin excipientes) preparada de una primer cepa *Neisserial* se administra a un individuo. La primer composición antigénica se administra generalmente en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune (por ejemplo, activación de
25 células T y/o B). Las cantidades para la inmunización inicial generalmente varían desde aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 1.0 mg por 70 kilogramos del paciente, más comúnmente desde aproximadamente 0.001 mg a

aproximadamente 0.2 mg por 70 kilogramos del paciente. Las dosis de 0.001 hasta aproximadamente 10 mg por paciente por día deben utilizarse, particularmente cuando el antígeno se administra a un sitio apartado y no en la corriente sanguínea, tal como en una cavidad corporal o en un lumen de un
5 órgano. Substancialmente, dosis más elevadas (por ejemplo, 10 a 100 mg o más) son posibles en administración oral, nasal o tópica.

Después de la administración de la primer composición de antígeno, una dosis terapéuticamente eficaz de una segunda composición de antígeno (por ejemplo, MV, OMV, antígeno asilado, o combinaciones de
10 antígenos, con o sin excipientes) preparada de una segunda cepa *Neisserial* se administra a un individuo después de que el individuo se ha preparado inmunológicamente por exposición a la primer composición de antígeno. La inyección de refuerzo puede administrarse días, semanas o meses después de la inmunización inicial, dependiendo de la condición y respuesta del paciente.
15 La existencia de una respuesta inmune a la primer composición de antígeno puede determinarse por métodos conocidos (por ejemplo, al obtener suero del individuo antes y después de la inmunización inicial, y demostrando un cambio en el estado inmune del individuo, por ejemplo, un análisis de inmunoprecipitación, o una ELISA, o un análisis bactericida, o una Western
20 blot, o análisis citométrico de flujo, o lo similar) y/o demostrando que la magnitud de la respuesta inmune a la segunda inyección es más elevada que aquella de los animales de control inmunizados para el primer momento con la composición de materia utilizada para la segunda inyección (por ejemplo, preparación inmunológica). La preparación inmunológica y/o la existencia de
25 una respuesta inmune a la primer composición de antígeno también puede asumirse al esperar un periodo de tiempo después de la primer inmunización que, en base a experiencia previa, es un tiempo suficiente para que una

respuesta inmune y/o preparación tenga lugar, por ejemplo, 2, 4, 6, 10 ó 14 semanas. Las dosis de inyección de refuerzo de la segunda composición de antígeno son típicamente desde aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 1.0 mg de antígeno, dependiendo de la naturaleza del inmunogen y vía de inmunización.

En ciertas modalidades preferidas, una dosis terapéuticamente eficaz de una tercer composición de antígeno de una tercer cepa *Neisserial* se administra a un individuo después de que el individuo se ha preparado y/o montado una respuesta inmune a la segunda composición de antígeno. La tercer inyección de refuerzo puede administrarse días, semanas o meses después de la segunda inmunización, dependiendo de la condición y respuesta del paciente. La existencia de preparación y/o una respuesta inmune a la segunda composición de antígeno puede determinarse por los mismos métodos utilizados para detectar una respuesta inmune a la segunda composición de antígeno. La existencia de preparación y/o una repuesta inmune a la segunda composición de antígeno puede también asumirse al esperar por un periodo de tiempo después de la segunda inmunización que, en base a la experiencia previa, es un tiempo suficiente para que una respuesta inmune y/o preparación tenga lugar, por ejemplo, 2, 4, 6, 10 ó 14 semanas. Las dosis de inyección de refuerzo de la segunda composición de antígeno son típicamente desde aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 1.0 mg de antígeno, dependiendo de la naturaleza del inmunogen y vía de inmunización. La presente invención contempla además el uso de una cuarta, quinta, sexta o más inmunización de inyección de refuerzo, utilizando ya sea una cuarta, quinta o sexta cepa de *Neisseria meningitidis* o cualquiera de las primeras, segunda, o tercer cepa, u otra cepa que es genéticamente diversa con respecto a al menos una primer, segunda y tercer cepa.

Cuando la administración de composiciones antigénicas preparadas de la primer, segunda y (opcionalmente, pero preferentemente) tercer cepa es serial, el orden de administración de la composición puede variarse. Por ejemplo, el orden de administración de OMV y/o MV dentro de estas etapas de administración serial puede variarse. Por ejemplo, los siguientes ordenes de administración se encuentran dentro del alcance de la invención (de izquierda a derecha, con la tercer administración siendo opcional): OMV-OMV-OMV; OMV-OMV-MV; OMV-MV-MV; MV-MV-MV; MV-MV-OMV; MV-OMV-OMV; OMV-MV-OMV; y MV-OMV-MV. Preferentemente, el orden de administración es MV-MV-OMV.

En otras modalidades, la primer, segunda y (opcionalmente) tercer composición de antígeno se administran como una mezcla. En modalidades relacionadas, la primer y segunda composición de antígeno se administran como una mezcla, y la tercer composición de antígeno se administra subsecuentemente.

Las mezclas se administran en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune, particularmente una respuesta inmune humoral, en el huésped. Las cantidades para la inmunización de la mezcla generalmente varían desde aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 1.0 mg por 70 kilogramos del paciente, más comúnmente desde aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 0.2 mg por 70 kilogramos del paciente. Las dosis de 0.001 hasta aproximadamente 10 mg por paciente por día pueden utilizarse, por ejemplo, cuando el antígeno se administra a un sitio apartado y no en la corriente sanguínea, tal como en una cavidad corporal o en un lumen de un órgano. Las dosis substancialmente más elevadas (por ejemplo, 10 a 100 mg o más) son posibles en administración oral, nasal o tópica. La administración inicial de la mezcla puede seguirse por inmunización de inyección de refuerzo

de la misma o diferente mezcla, con al menos una inyección de refuerzo, más usualmente dos inyecciones de refuerzo, prefiriéndose.

En ciertas modalidades preferidas, la primer y segunda cepa *Neisserial*, son genéticamente diversas entre sí, por ejemplo, las cepas pertenecen a diferentes serotipos PorB y/o serosubtipos PorA; y también pueden pertenecer opcionalmente a diferentes serogrupos capsulares. Además, la segunda y tercer cepa *Neisserial* son genéticamente diversas entre sí, por ejemplo, las cepas pertenecen a diferentes serotipos y/o serosubtipo; también pueden pertenecer opcionalmente a diferentes serogrupos. La tercer cepa *Neisserial* preferentemente es genéticamente diversa con respecto a la primer y segunda cepa, pero puede, en algunas modalidades, no ser genéticamente diversa con respecto a la primer cepa. Por ejemplo, el serotipo y/o serosubtipo de la tercer cepa *Neisserial* debe ser preferentemente diferente de la primer y segunda cepa pero puede ser la misma que la primer cepa. La presente invención también contempla específicamente que las composiciones de antígeno de otros miembros del género *Neisseria* pueden administrarse como se describe en la presente para generar inmunidad protectora contra *Neisseria meningitidis*. Por ejemplo, *Neisseria lactamica*, un miembro comensal no encapsulado no patológico del género *Neisseria* que se encuentra comúnmente en la nasofaringe humana, comprende cepas que tienen muchos antígenos presentes en *N. meningitidis* y, por lo tanto, también puede utilizarse para preparar uno de los inmunógenos comprendidos en esta invención. De esta manera, MVs u OMVs de la *Neisseria lactamica* no patológica puede utilizarse para preparar o producir una respuesta inmune protectora contra *Neisseria meningitidis* (o contra otra *Neisseria* patológica tal como *Neisseria gonorrhea*). Esto puede realizarse al administrar inicialmente una composición de antígeno (por ejemplo, MV u OMV) de *Neisseria lactamica*, seguida al

administrar una segunda y opcionalmente una tercer composición de antígeno de *Neisseria meningitidis* (o *Neisseria gonorrhea*). La invención contempla específicamente también que las composiciones de antígeno de cepas de *Neisseria lactamica* se utilicen para la administración inicial, segunda y cualquier subsecuente, en donde cada cepa de *lactamica* tiene un serotipo y/o serosubtipo diferente que los otros.

La invención también contempla que las composiciones de antígeno utilizadas en cualquier etapa en el procedimiento de inmunización pueden obtenerse de una o más cepas de bacterias (especialmente *Neisseria lactamica* o *Neisseria meningitidis*) que se forman genéticamente por métodos conocidos (ver, por ejemplo, Pat. de E.U. No. 6,013,267) para expresar uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más moléculas de interés, particularmente moléculas que producen o mejora una respuesta inmune protectora. Los ácidos nucleicos puede, por ejemplo, codificar Porin A, Porin B, NspA, pilin u otras proteínas *Neisserial*. Otros ácidos nucleicos ejemplificativos incluyen aquellos que codifican proteínas *Neisserial* inmunoprecipitadas con anti-sueros producidos después de la vacunación con la vacuna CHORI, particularmente aquellas proteínas que tienen masas moleculares aparentes de aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 59.5 kDa, aproximadamente 40.7 kDa, aproximadamente 39.6 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 27.9 kDa, y 14.5 kDa, o fragmentos antigénicos de los mismos. Los ácidos nucleicos ejemplificativos, adicionales incluyen aquellos que codifican las proteínas *Neisserial* detectadas por Western blot con anti-sueros productos después de la vacunación con la vacuna CHORI, particularmente aquellas proteínas que tienen masas moleculares aparentes de aproximadamente 53 kDa-57 kDa; aproximadamente 46-47 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 20 kDa a 21 kDa; y aproximadamente 18 kDa. Los ácidos

nucleicos pueden codificar cualquiera de las proteínas anteriores que se trunca, o altera para incluir o eliminar un sitio de glucosilación, o para incluir o eliminar cualquier epítopo, o para incrementar la expresión de cualquiera de las proteínas anteriores. De particular interés son los fragmentos antigénicos de tales proteínas. Además, las composiciones de antígeno de la invención pueden comprender antígenos adicionales de *N. meningitidis* tales como aquellos ejemplificados en las publicaciones de PCT Nos. WO 99/24578, WO 99/36544; WO 99/57280, WO 00/22430 y WO 00/66791, así como también fragmentos antigénicos de tales proteínas.

Un aspecto importante de la presente invención es que las composiciones de antígeno utilizadas para preparar e cargar una inmunidad protectora amplia contra *Neisseria meningitidis* se preparan de cepas de *Neisseria* que poseen antígenos inmunodominantes variantes (los antígenos principales que se detectan rutinariamente por antisueros de diferentes animales huésped que se han infectado con *Neisseria*; ejemplos representativos incluyen Porin A, Porin B, pilin, NspA etc.). En los ejemplos descritos en la sección de Ejemplos de abajo, las cepas pueden variar con respecto a ya sea PorA o PorB, como se evidencia por su serotipo o serosubtipo. Las cepas también pueden variar con respecto a la molécula de cápsula, como se refleja por su serogrupo.

La clasificación de serosubtipo y serotipo se determina actualmente al detectar cual de un panel de monoclonales conocidos, que se conocen por reconocer moléculas de Porin específicas, se une a una cepa desconocida (Sacchi *et al.*, 1998, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5:348, ver Tablas 8 y 9 para listas parciales de monoclonales). Es probable que otros monoclonales se identifiquen. El uso de cualquier serotipo o serosubtipo que puede definirse por cualquier monoclonal nuevo se contempla específicamente por la invención.

Además, los serotipos y serosubtipos pueden definirse, no solamente por la interacción con anticuerpos monoclonales, sino que también estructuralmente por la ausencia y/o presencia de residuos de péptido definidos y epítopos de péptido (Sacchi *et al.*, 2000, *J. Infect. Dis.* 182:1169). Los esquemas de
5 clasificación se serosubtipo y serotipo que se basan en características estructurales de las Porinas (conocidas o que pueden descubrirse en una fecha posterior) se comprenden específicamente por la invención.

Un propósito y efecto de administración serial de composiciones de antígeno de diferentes cepas es potenciar una respuesta inmune a antígenos y
10 epítopos que son típicamente no inmunodominantes, particularmente epítopos no inmunodominantes que muestran menos variabilidad genética que los epítopos inmunodominantes conocidos. La invención comprende específicamente la administración serial de composiciones de antígeno de cepas *Neisseria* que difieren con respecto a los antígenos inmunodominantes
15 diferentes a Porinas (por ejemplo, fosfolípidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, pilinas, OmpA, Opa, Opc, etc.).

Las composiciones de antígeno se administran típicamente a un mamífero que es inmunológicamente inocente con respecto a *Neisseria meningitidis*. En una modalidad particular, el mamífero es un niño humano
20 aproximadamente de cinco años o más joven, y preferentemente de aproximadamente dos años o más joven, y las composiciones de antígeno se administran en cualquiera o más de los siguientes tiempos: dos semanas, un mes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 meses, o un año o 15, 18 ó 21 meses después del nacimiento, o a los 2, 3, 4 ó 5 años de edad.

25 En general, la administración a cualquier mamífero se inicia preferentemente antes de la primer señal de síntomas de enfermedad, o en la primer señal de exposición actual o posible a *Neisseria*.

Cuando los péptidos inmunogénicos particulares que dan origen a inmunidad protectora se identifican como se describe arriba y abajo, estos antígenos pueden administrarse directamente en lugar de MVs u OMVs. Cuando los antígenos identificados son péptidos, el ADN que codifica uno o
5 más de los péptidos de la invención también pueden administrarse al paciente. Este planteamiento se describe, por ejemplo, en Wolff *et al.*, *Science* 247:1465-1468 (1990), así como también las Patentes de E.U. Nos. 5,580,859 y 5,589,466.

3. Detección de antígenos inmunogénicos

10 Las fracciones subcelulares tales como MVs y OMVs contienen muchos antígenos que pueden dar origen a una respuesta inmune (ver, por ejemplo, Figura 2 que representa un gel electroforético de varias tales fracciones). Sin embargo, no cada antígeno en una preparación puede producir ya sea una respuesta humoral o inmunidad protectora contra una enfermedad
15 causada por una *Neisseria meningitidis* spp. De esta manera, la presente invención también se refiere a antígenos individuales y/o combinaciones de antígenos que inducen inmunidad protectora. Otro objetivo es utilizar los antígenos identificados para formular las composiciones de antígeno que pueden utilizarse para producir inmunidad protectora contra una enfermedad
20 por *Neisseria*.

Los antisueros o mAbs se obtienen o producen de mamíferos que se inducen por los métodos de la presente invención para exhibir Inmunidad protectora contra una enfermedad causada por una *Neisseria meningitidis* spp. Los antisueros o mAbs se utilizan para detectar sus antígenos *Neisseria*
25 correspondientes, y estos antígenos identificados y aislados en base a sus propiedades fisicoquímicas (clase de molécula: péptido, ácido nucleico, etc.; masa molecular, carga, composición química, etc) o secuencia de aminoácidos.

Los antígenos aislados (o porciones inmunológicamente eficaces de los mismos) pueden administrarse entonces a mamíferos, solos y/o en combinación) para valorar el grado al cual inducen inmunidad protectora. La presente invención contempla específicamente administrar serialmente
5 antígenos aislados de una cepa o diferentes cepas de *Neisseria*, o administrar tales antígenos en una mezcla que comprende uno o más, usualmente dos o más, más usualmente tres o más, aún más usualmente cuatro a seis o más antígenos.

Los antígenos *Neisserial* ejemplificativos adecuados para su
10 administración como se describe pueden incluir, pero no necesariamente limitarse a aquellas proteínas inmunoprecipitadas con anti-sueros producidos después de la vacunación con la vacuna CHORI, particularmente aquellas proteínas que tienen masas moleculares aparentes de aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 59.5 kDa, aproximadamente 40.7 kDa, aproximadamente
15 39.6 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 27.9 kDa, y 14.5 kDa, o fragmentos antigénicos de los mismos. Los antígenos administrados pueden incluir al menos uno de estos antígenos, o pueden incluir una combinación de estos antígenos (por ejemplo, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o más).

20 Antígenos *Neisserial* ejemplificativos, adicionales adecuados para su administración como se describe pueden incluir, pero no necesariamente limitarse a aquellas proteínas detectadas por Western blot con anti-sueros producidos después de la vacunación con la vacuna CHORI, particularmente aquellas proteínas que tienen masas moleculares aparentes de
25 aproximadamente 53 kDa-57 kDa; aproximadamente 46-47 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 20 kDa a 21 kDa; y aproximadamente 18 kDa, o fragmentos antigénicos de los mismos. Los

antígenos administrados pueden incluir al menos uno de estos antígenos, o pueden incluir una combinación de estos antígenos (por ejemplo, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o más).

Debe observarse que las referencias hechas a masas moleculares de proteínas se refieren a masa molecular aparente como se determina por SDS-PAGE bajo las condiciones descritas. Debe ser fácilmente aparente para el experto en la materia en la consideración de la presente especificación que estas masas moleculares aparentes pueden variar para la misma proteína entre dos diferentes experimentos (por ejemplo, utilizando diferentes geles o diferentes preparaciones, cuando se aíslan de dos cepas diferentes (por ejemplo, debido a polimorfismos entre cepas debido a sustituciones de aminoácidos, eliminaciones y/o inserciones, modificaciones post-translacionales, y lo similar)) y además que diferentes proteínas pueden parecer tener la misma masa molecular aparente.

Los antígenos que producen inmunidad protectora se detectan por métodos conocidos: por ejemplo, inmunoanálisis, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, Western blots, etc. Ejemplos de tales métodos se describen abajo.

(a) Detección de Antígenos por Inmunoanálisis

Una variedad de formatos de inmunoanálisis se utilizan para caracterizar antisueros y anticuerpos específicamente inmunoreactivos con un antígeno particular o composición antigénica, y también para medir la intensidad de una respuesta inmune a un antígeno particular o composición antigénica. La primer etapa es producir generalmente antisuero o una preparación de anticuerpo que se une al antígeno o composición antigénica.

(1) Producción de Antisueros Inmunes y Anticuerpos Monoclonales o Policlonales Específicos

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales y policlonales utilizados en estos análisis se conocen por aquellos de experiencia en la materia. Ver, por ejemplo, Coligan (1991), **CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY**, Wiley/Greene, NY; y Harlow and Lane (1989), **ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL**, Cold Spring Harbor Press, NY; Stites *et al.*, (eds.) 1997 **MEDICAL IMMUNOLOGY** 9th ed. McGraw-Hill Professional Publishing, Nueva York, NY, y referencias citadas en la presente; Goding (1986), **MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE** (2d ed.) Academic Press, Nueva York, NY; y Kohler and Milstein (1975), *Nature*, 258: 495-497.

10 Por ejemplo, con objeto de producir antisueros para utilizarse en un inmunoanálisis, una composición que contiene antígenos de *Neisseria meningitidis* spp, se da sola o mezclada con un adyuvante y se inyecta en un animal de elección (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, puerco, cabra, vaca, caballo, pollo, etc.) de acuerdo a cualquier procedimiento descrito en la

15 presente.

La respuesta inmune del animal a la preparación de inmunogen se monitorea al tomar sangrados prueba y determinar la concentración de reactividad de alícuotas serialmente diluidas de suero a alícuotas serialmente diluidas de la composición antigénica. Los antisueros policlonales con una

20 concentración de 10^4 o mayor se seleccionan y prueba para su reactividad transversal contra controles no inmunogénicos, utilizando un Inmunoanálisis de unión competitivo. Los anticuerpos policlonales o monoclonales y antisueros usualmente se unirán con una constante de disociación (K_D) de al menos aproximadamente 0.1 mM, más usualmente al menos aproximadamente 1 μ M,

25 preferentemente al menos aproximadamente 0.1 μ M o mejor, y más preferentemente, .01 μ M o mejor.

(2) Anticuerpos monoclonales

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales de varios huéspedes mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, humanos, etc. La descripción de técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales se encuentra en, por ejemplo, Stites *et al.*, *Supra*, y las referencias citadas en la presente; Harlow and Lane, *Supra*; Goding *Supra.*, y Kohler and Milstein. *Supra*. Resumido brevemente, este método procede al inyectar a un animal con una preparación inmunogénica. El animal se sacrifica entonces y las células se toman de su bazo, que se fusiona con células de mieloma. El resultado es una célula híbrida o "hibridoma" que es capaz de reproducirse *in vitro*. La población de hibridomas se selecciona entonces para aislar los clones individuales, cada uno de los cuales secreta una especie de anticuerpo única al inmunogen. De esta manera, las especies de anticuerpo individuales son los productos de células B únicas clonadas e immortalizadas del animal inmune generados en respuesta a un sitio específico reconocido en la sustancia inmunogénica.

Los métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con Virus Eipstein Barr, oncógenos, o retrovirus, u otros métodos conocidos en la materia. Las colonias que se originan de células immortalizadas únicas se seleccionan para la producción de anticuerpos de la afinidad y especificidad deseada para el antígeno, y producción de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células se aumenta por varias técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado (preferentemente mamífero).

Otras técnicas adecuadas incluyen la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fago o vectores similares (ver, por ejemplo, Huse *et al.*, (1998) *Science* 246:1275-1281; Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546; y Vaughan *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14:309-314).

(3) Inmunoanálisis

Una vez que un suero inmune o un anticuerpo monoclonal que reconoce uno o más antígenos *Neisserial* se obtiene, puede utilizarse para realizar inmunoanálisis. Para un resumen de procedimientos de inmunoanálisis e inmunológicos en general, ver D. Stites and A. Terr, (eds.), *Supra*. Además, los inmunoanálisis de la presente invención pueden realizarse de cualquiera de las varias configuraciones, que se revisan extensivamente en ENZYME IMMUNOASSAY, E.T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Ratón, Florida (1980); "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," P. Tijssen, en LABORATORY
10 TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam (1985); y Harlow and Lane, *supra*, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia.

Por ejemplo, los inmunoanálisis ELISA de fase sólida se utilizan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales especialmente
15 Inmunoreactivos con un antígeno. Ver Harlow and Lane, *Supra*.

Los antisueros agrupados y/o imunoabsorbidos (o anticuerpos monoclonales) también se utilizan en un inmunoanálisis de unión directa o competitivo. El último compara la unión de una segunda composición de antígeno (por ejemplo, MVs, OMVs, antígenos aislados o composiciones de
20 antígeno de una cepa *Neisseria* diferente conocida o desconocida) a aquella de la composición de antígeno de referencia utilizada para producir inmunidad protectora. Con objeto de hacer esta comparación en el análisis competitivo, las dos preparaciones de antígeno se analizan cada una en un amplio rango de concentraciones y se determina la cantidad de cada molécula requerida para
25 inhibir 50% de la unión de los antisueros a la preparación de antígeno de referencia inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína requerida es menor a 10 veces la cantidad del péptido de referencia utilizada para hacer el

anticuerpo, entonces la segunda proteína se une específicamente a un anticuerpo generado para la preparación de antígeno de referencia.

(b) Western Blots

El análisis Western Blot generalmente comprende separar
5 productos por electroforesis de gel en la base de peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nylon, o filtro de nylon derivado) e incubar la muestra con anticuerpos de marcado que se unen específicamente a la proteína de analito. Los anticuerpos de marcado se unen específicamente a analito en el soporte sólido.
10 Estos anticuerpos se marcan directamente, o alternativamente se detectan subsecuentemente utilizando agentes de marcado tales como anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de anti-ratón de oveja marcados en donde el anticuerpo para un analito es un anticuerpo de murino) que se une específicamente al anticuerpo de marcado.

(4) Purificación de Antígenos Inmunogénicos

Los antígenos pueden aislarse (separarse de una o más moléculas con la cual el antígeno se asocia *in vivo*) y purificarse (un antígeno purificado, por ejemplo, una proteína, preferentemente muestra esencialmente una banda
única en un gel electroforético para cada subunidad disociable del antígeno) y
20 utilizarse para producir inmunidad protectora.

Los antígenos individuales, especialmente proteínas y fragmentos de péptidos de los mismos, pueden purificarse por cualquiera de una variedad de técnicas conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía líquida de desempeño elevado de fase inversa (HPLC), intercambio de ión o cromatografía
25 de inmunoadfinidad, separación por tamaño, o electroforesis (ver generalmente, Scopes, R. *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Por ejemplo, los antígenos de *Neisseria meningitidis* spp. se obtienen al utilizar antisueros de

espectro amplio para generar preparaciones ricas en antígeno. Los antígenos aislados también pueden prepararse al inmunoprecipitar una fracción obtenida de *Neisseria meningitidis* spp. Los antígenos también pueden aislarse al conjugar antisueros inmunes o anticuerpos monoclonales a una columna y desempeñar cromatografía de afinidad. La fuente de los antígenos pueden ser un lisato de célula total obtenido por métodos conocidos, por ejemplo, por sonicación, o alternativamente por exposición a un detergente iónico o no iónico, o la fuente puede ser MVs u OMVs de una cepa *Neisserial*.

5. Antígenos de Péptido

Además, una vez que la identidad de los antígenos de proteína y/o epítopos de péptido específicos se establece, las preparaciones de antígeno de *Neisseria meningitidis* spp, adecuadas para inducir inmunidad protectora en la presente invención pueden generarse al sintetizar péptidos mediante técnicas convencionales, e inyectar preparaciones de péptido sintéticas en un mamífero. Las técnicas para síntesis de péptido se conocen bien en la materia. Ver, por ejemplo, Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Rockford, Ill., Pierce), 2d Ed. (1984) and Kent, 1988, *Annu. Rev. Biochem.* 57:957.

Alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos codifican el polipéptido particular pueden clonarse y expresarse para proporcionar el péptido. Las técnicas estándar pueden utilizarse para obtener y seleccionar bibliotecas de ácidos nucleicos para identificar secuencias que codifican las secuencias deseadas (ver Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), o ácidos nucleicos que codifican péptidos deseados pueden sintetizarse por métodos conocidos. Las proteínas de fusión (aquellas que consisten de todas o parte de las secuencias de aminoácidos de dos o más proteínas) pueden producirse recombinantemente. Además, utilizando técnicas de mutagenesis *in*

vivo, las proteínas sin relacionar pueden mutarse para comprender las secuencias apropiadas.

Se entenderá que los antígenos inmunogénicos de la presente invención pueden modificarse para proporcionar una variedad de atributos
5 deseados, por ejemplo, características farmacológicas mejoradas, mientras se incrementa o al menos retiene substancialmente toda la actividad biológica del péptido sin modificar. Por ejemplo, los péptidos pueden modificarse al extender, reducir la secuencia de aminoácidos del péptido. Las substituciones con diferentes aminoácidos o imitaciones de aminoácidos también pueden
10 hacerse.

Los péptidos empleados en la invención sujeto no necesitan ser idénticos a aquellos descritos en la sección de Ejemplos abajo (por ejemplo, con respecto a peso molecular), siempre que los péptidos sujetos sean capaces de inducir una respuesta inmune contra la molécula de antígeno deseada. De
15 esta manera, un experto reconocerá que un número de substituciones conservadoras (descritas en más detalle abajo) puede hacerse sin afectar substancialmente la actividad del péptido.

Las substituciones del aminoácido único, eliminaciones o inserciones pueden utilizarse para determinar que residuos son relativamente
20 insensibles a modificación. Las substituciones se hacen preferentemente con porciones relativamente neutrales, pequeñas tales como Ala, Gly, Pro o residuos similares. El efecto de substituciones de aminoácido único también puede probarse utilizando D-aminoácidos. Los números y tipos de residuos que se substituyen o agregan dependen del espacio necesario entre los puntos de
25 contacto esenciales y ciertos atributos funcionales que se enseñan (por ejemplo, hidrofobicidad contra hidrofiliidad). La inmunogenicidad incrementada también puede lograrse por tales substituciones, en comparación

con el péptido de origen. En cualquier caso, tales substituciones podrían emplear residuos de aminoácidos u otros fragmentos moleculares elegidos para evitar, por ejemplo, interferencia de carga y estérica que puede interrumpir la unión.

5 La substitución de aminoácidos, sin embargo, no necesita limitarse a aquellos que ocurren naturalmente en las proteínas, tales como L- α -aminoácidos, o sus D-isómeros. Los péptidos pueden substituirse con una variedad de porciones tales como imitaciones de aminoácido bien conocidas por aquellos de experiencia en la materia. (Ver, por ejemplo, Pat. de E.U. No.
10 6,030,619).

Los residuos individuales de los polipéptidos antigénicos inmunogénicos pueden incorporarse en el péptido por una unión de péptido o imitación de unión de péptido. Una imitación de unión de péptido de la invención incluye modificaciones de la estructura de péptido bien conocidas por
15 aquellos expertos en la materia. Tales modificaciones incluyen modificaciones del nitrógeno de amida, el α -carbono, carbonilo de amida, reemplazo completo de la unión de amida, extensiones, eliminaciones o degradaciones de la estructura. Ver, generalmente, Spatola, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. VII (Weinstein ed., 1983). Varias
20 modificaciones de la estructura del péptido se conocen. Estas incluyen $\psi[\text{CH}_2\text{S}]$, $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$, $\psi[\text{CSNH}_2]$, $\psi[\text{NHCO}]$, $\psi[\text{COCH}_2]$ y $\psi[(\text{E}) \text{ o } (\text{Z}) \text{CH}=\text{CH}]$. La nomenclatura utilizada arriba sigue aquella sugerida por Spatola, arriba. En este contexto, ψ indica la ausencia de una unión de amida. La estructura que reemplaza el grupo amida se especifica dentro de los corchetes.

25 Las imitaciones de aminoácido también pueden incorporarse en los péptidos. Una "imitación de aminoácido" como se utiliza aquí es una porción diferente a un aminoácido que ocurre naturalmente que sirve conformacional

como funcionalmente como un sustituto para un aminoácido en un polipéptido de la presente invención. Tal porción sirve como un sustituto para un residuo de aminoácido si no interfiere con la habilidad del péptido para producir una respuesta inmune contra el antígeno apropiado. Las imitaciones de aminoácido
5 pueden incluir aminoácidos sin proteína, tales como β - γ - δ -aminoácidos, β - γ - δ -iminoácidos (tal como ácido piperidina-4-carboxílico), así como también muchos derivados de L- α -aminoácidos. Un número de imitaciones de aminoácido adecuadas se conocen por los expertos; incluyen ciclohexilalanina, ácido 3-ciclohexilpropiónico, alanina L-adamantilo, ácido adamantilacético y lo similar.
10 Las imitaciones de péptido adecuadas para los péptidos de la presente invención se tratan por Morgan and Gainer, (1989) *Ann. Repts. Med. Chem.* 24:243-2526.

Como se observa arriba, los péptidos empleados en la invención sujeto no necesitan ser idénticos, pero puede ser substancialmente idénticos, a
15 la secuencia correspondiente del antígeno objetivo. Por lo tanto, los péptidos pueden estar sujetos a varios cambios, tales como inserciones, eliminaciones, y substituciones, ya sea conservadoras o no conservadoras, en donde tales cambios pueden proporcionar ciertas ventajas en su uso. Los polipéptidos de la invención pueden modificarse en un número de maneras siempre que
20 comprendan una secuencia substancialmente idéntica (como se define abajo) a una secuencia en la región objetivo del antígeno.

La alineación y comparación de las secuencias de aminoácidos relativamente cortas (menores a aproximadamente 30 residuos) es típicamente recta. La comparación de secuencias más largas puede requerir más métodos
25 sofisticados para lograr una alineación óptima de dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede conducirse por el algoritmo de homología local de Smith and Waterman

(1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, por la búsqueda para el método de similitud de Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2444, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, que resulta en el porcentaje más elevado de similitud de secuencia sobre la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

10 Los términos "idéntico" o por ciento de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos o aminoácidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos, cuando se compara y alinea para máxima correspondencia, como se mide
15 utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o inspección visual. Preferentemente, la identidad substancial existe sobre una región de las secuencias que es al menos aproximadamente 50 residuos en longitud, más preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y más preferentemente las secuencias son substancialmente
20 idénticas sobre al menos aproximadamente 150 residuos. En una modalidad más preferida, las secuencias son substancialmente idénticas sobre la longitud completa de las regiones de codificación.

 Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual las secuencias de prueba se
25 comparan. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de referencia y prueba, se introducen en una computadora, se diseñan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se diseñan los

parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba relativo a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa diseñados.

5 La alineación óptima de secuencias para su comparación puede conducirse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman and Wunsch 48:443 (1970), por la búsqueda para el método de similitud de Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 10 85:2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual (ver generalmente, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, una ventura de articulación entre 15 Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (Complemento 1995) (Ausubel).

Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschuel *et al.*, (1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389- 20 3402, respectivamente. El Software para realizar análisis BLAST se encuentra públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo incluye identificar primero pares de secuencia con puntuación elevada (HSPs) al identificar 25 palabras cortas de longitud W en la secuencia interrogante, que ya sea se ajusta o satisface alguna puntuación T de umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de bases de

datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra en proximidad (Altschul *et al.*, *supra*).

Estos aciertos de la palabra en proximidad inicial actúan como simientes para iniciar las búsquedas para encontrar HSPs más largos que la
5 contienen. Los aciertos de la palabra se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de alineación acumulativa pueda incrementarse. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos de acoplamiento; siempre >
10 0) y N (puntuación de penalidad para residuos sin acoplamiento; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de la palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae por la cantidad X desde su valor máximo logrado; la puntuación
15 acumulativa va a cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST (para secuencias de nucleótidos) utiliza como fallas una longitud de palabra (W) de
20 11, una expectación (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambos filamentos. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como fallas una longitud de palabra (W) de 3, una expectación (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:10915 (1989)).

25 Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*

90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual un acoplamiento entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos podría ocurrir por suerte. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.1, más preferentemente menor que aproximadamente 0.01 y más preferentemente menor que aproximadamente 0.001.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son substancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe abajo. De esta manera, un polipéptido típicamente es substancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son substancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridizan entre sí bajo condiciones severas, como se describe abajo.

Preferentemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren al intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticos es fenilalanina, tirosina, y

triptofan; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de substitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-
5 isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

Los polipéptidos comprendidos por la invención típicamente comprenden al menos aproximadamente 10 residuos y más preferentemente al menos aproximadamente 15 residuos, preferentemente de un dominio del
10 antígeno que se expone al sistema inmune. En ciertas modalidades, los péptidos no excederán aproximadamente 50 residuos y típicamente no excederán aproximadamente 30 residuos.

Los péptidos inmunogénicos se limitan conformacionalmente. Los medios para lograr esto se conocen bien en la material (ver, por ejemplo, Hruby
15 and Bonner en *Methods in Molecular Biology, Volumen 35 Peptide Synthesis Protocols*, Pennington and Dunn eds (Humana Pres, Totowa, NJ 1994). Un medio preferido para preparar péptidos conformacionalmente limitados se a través de ciclización. Cualquier método comúnmente utilizado para producir oligopéptidos ciclizados puede utilizarse para producir los péptidos de la
20 invención. Por ejemplo, en ciertas modalidades los péptidos incluirán residuos de cisteína en ambos términos, que permiten la producción de péptidos cíclicos a través de enlaces de disulfuro. El tratamiento de tal péptido con un agente oxidante tal como oxígeno, yodo o agente similar producirá un péptido cíclico que puede purificarse además utilizando método cromatográfico u otros de
25 purificación química. La construcción de péptidos cíclicos también puede realizarse a través de enlaces de tioéter. Por ejemplo, los péptidos N-bromoacetil-derivados pueden reaccionarse con residuos que contienen

sulfhidrilo, tales como cisteína. La ciclización ocurre por la reacción del sulfhidrilo libre de cisteína en el péptido con el grupo bromoacetilo para formar un enlace de tioéter (Robey *et al.*, *Anal. Biochem* 177:373-7 (1989) y Patente de E.U. No. 5,066,716).

5 Otros métodos para construir péptidos cíclicos se conocen por aquellos expertos en la materia. Estos incluyen ciclizaciones de cadena lateral-cadena lateral, cadena lateral-cadena principal y cadena principal-cadena principal. Además, los enlazadores pueden utilizarse para unir los términos, amino y carboxilo, de un péptido. En enlazador es capaz de formar uniones
10 covalentes tanto al término amino como carboxilo. Los enlazadores adecuados se conocen bien por aquellos expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, enlazadores de carbono de cadena recta o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos, o enlazadores de péptido. Los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos de termino amino y carboxilo a través de sus grupos
15 laterales (por ejemplo, a través de un enlace de disulfuro a cisteína) o a través de grupos carboxilo y amino de carbono alfa de los aminoácidos terminales.

Para una discusión general de métodos adecuados para ciclización, ver Hruby and Bonner in *Methods in Molecular Biology, Volumen 35 Peptide Synthesis Protocols*, Pennington and Dunn eds (Humana Pres, Totowa, NJ
20 1994). Por ejemplo, las ciclizaciones pueden incluir la formación de análogos carba y tioéteres (Lebl *et al.*, in *Peptides 1986 Proceedings of the 19th European Peptide Symposium* pp. 341-344; Robey *et al.*, *Anal. Biochem.* 177:373-7 (1989) y la Patente de E.U. No. 5,066,716), bis-tioéteres (Mosberg *et al.*, *JACS* 107:2986-2987 (1985)), azopéptidos (Siemion *et al.*, *Mol. Cell.*
25 *Biochem.* 34:(1991)), y otras estructuras cíclicas, tales como estructuras de puente (Charpentier, M., *et al.*, *J. Med. Chem.* 32(6):1184-1190 (1989), Thaisrivongs, S., *et al.*, *J. Med. Chem.* 34(4):127(1991) y Ozeki, E., *et al.*, *Int.*

J. Peptide Protein Res. 34:111 (1989)). La ciclización de posiciones estructural a estructura también puede utilizarse.

El puente es un tipo especial de ciclización en el cual los sitios distantes en un péptido se unen utilizando fragmentos o moléculas de puente
5 separados. Las moléculas de puente pueden incluir, por ejemplo, moléculas de anhídrido succínico (Charpentier, B., *et al.*, *supra*) y fragmentos de carboximetileno (Thaisrivongs, S., *et al.*, *supra*). El puente por metales también puede utilizarse (Ozeki, E., *et al.*, *supra*).

En algunas modalidades, los péptidos incluyen dos o más residuos
10 de cisteína. Las cisteínas pueden substituirse o agregarse dentro del péptido o en cualquier término. La posición de las cisteínas no es crítica siempre que los enlaces de disulfuro puedan formarse entre ellas lo que permite la producción de péptidos cíclicos. Por ejemplo, el tratamiento de tal péptido con un agente oxidante tal como oxígeno, yodo o agente similar producirá un péptido cíclico
15 que puede purificarse además utilizando método cromatográfico u otros métodos de purificación química.

Las modalidades adicionales incluyen péptidos que contienen secuencias antigénicas de secuencias de proteína que se han incorporado independientemente en péptidos de doblez (Regan & DeGrado, 1988, *Science*
20 241:976; Mutter, 1988, *TIBS* 13:260; Kamtekar *et al.*, 1993, *Science* 262:1680; Sieber & Moe, 1996, *Biochemistry* 35:181; Butcher & Moe, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1135, FitzGerald *et al.*, 1998 *Biochemistry* 273:9951). Los péptidos independientemente de doblez pueden ocurrir naturalmente o ser de diseño nuevo.

25 Los péptidos capaces de producir inmunidad protectora similar a aquella de la vacuna CHORI pueden también obtenerse al utilizar anticuerpos monoclonales producidos por inmunización con antígeno CHORI o lo similar

para seleccionar imitaciones moleculares de bibliotecas de péptido de despliegue de fago u otras bibliotecas de combinación tales como moléculas pequeñas o ácidos nucleicos.

Además de utilizar los péptidos, los anticuerpos originados contra
5 péptidos de la invención pueden utilizarse para inhibir respuestas inflamatorias. Los anticuerpos pueden originarse para los péptidos de la presente invención utilizando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la materia. Los anticuerpos anti-idiotípicos también pueden generarse. La siguiente descripción se presenta como un resumen general de las técnicas disponibles,
10 sin embargo, un experto en la materia reconocerá que muchas variaciones en los siguientes métodos se conocen.

Frecuentemente, los péptidos y anticuerpos de la invención se marcarán mediante unión, ya sea covalente o no covalentemente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Una amplia variedad de
15 marcas y técnicas de conjugación se conocen y se reportan extensivamente tanto en literatura científica como de patente. Las marcas adecuadas incluyen radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, porciones fluorescentes, porciones quimioluminescentes, partículas magnéticas y lo similar. Las patentes que enseñan el uso de tales marcas incluyen Patentes de
20 E.U. Nos. 3,817,837, 3,850,752, 3,939,950, 3,966,345, 4,277,437, 4,275,149 y 4,366,241. También, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse. Ver Cabilly, Patente de E.U. No. 4,816,567; y Queen *et al.*, (1989) *Proc Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033.

6. Inmunidad Pasiva

25 Los anticuerpos inmunoprotectores que reconocen epítopos de *Neisseria* también pueden administrarse a un organismo (por ejemplo, un paciente humano) para inducir inmunidad pasiva contra una enfermedad

Neisserial, ya sea para prevenir que la infección o enfermedad ocurra, o como una terapia para mejorar el resultado clínico en pacientes con enfermedad establecida (por ejemplo, tasa de complicación reducida tal como ataque, tasa de mortalidad reducida, o morbilidad reducida, tal como sordera).

5 Los anticuerpos administrados a un organismo diferente a las especies en las cuales se origina con frecuencia son inmunogénicos. De esta manera, por ejemplo, los anticuerpos de porcino o murino administrados a un humano con frecuencia inducen una respuesta inmunológica contra el anticuerpo. Las propiedades inmunogénicas del anticuerpo se reducen al
10 alterar las porciones, o todo, el anticuerpo en secuencias característicamente humanas produciendo así anticuerpos quiméricos o humanos, respectivamente.

 Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina que comprenden una porción humana y no humana. Más específicamente, la región de combinación del antígeno (o región variable) de un anticuerpo quimérico
15 humanizado se deriva de una fuente no humana (por ejemplo, murino), y la región constante del anticuerpo quimérico (que confiere función de efecto biológico a la inmunoglobulina) se deriva de una fuente humana. El anticuerpo quimérico debe tener la especificidad de unión de antígeno de la molécula de anticuerpo no humano y la función de efecto conferida por la molécula de
20 anticuerpo humano. Un número grande de métodos para generar anticuerpos quiméricos se conocen bien por aquellos expertos en la materia (ver, por ejemplo, Patentes de E.U. Nos. 5,502,167, 5,500,362, 5,491,088, 5,482,856, 5,472,693, 5,354,847, 5,292,867, 5,231,026, 5,204,244, 5,202,238, 5,169,939, 5,081,235, 5,075,431 y 4,975,369). Un planteamiento alternativo es la
25 generación de anticuerpos humanizados al enlazar las regiones CDR de anticuerpos no humanos a regiones constantes humanas mediante técnicas de ADN recombinante. Ver Queen *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad. Sci. USA*

86:10029-10033 (1989) y WO 90/07861.

En una modalidad preferida, el vector de ADN recombinante se utilizar para transfectar una estirpe que produce un anticuerpo contra un péptido de la invención. El nuevo vector de ADN recombinante contiene un

5 "gen de reemplazo" para reemplazar todo o una porción del gen que codifica la región constante de inmunoglobulina en la estirpe (por ejemplo, un gen de reemplazo puede codificar toda o una porción de una región constante de una inmunoglobulina humana, una clase de inmunoglobulina específica), y una

10 "secuencia objetivo" que permite la recombinación homóloga objetivo con secuencias de inmunoglobulina dentro de la célula que produce el anticuerpo.

En otra modalidad, un vector de ADN recombinante se utiliza para transfectar una estirpe que produce un anticuerpo que tiene una función de efecto deseado (por ejemplo, una región constante de una inmunoglobulina humana), en tal caso, el gen de reemplazo contenido en el vector recombinante

15 puede codificar toda o una porción de una región de un anticuerpo y la secuencia objetivo contenida en el vector recombinante permite la recombinación homóloga y la modificación del gen objetivo dentro de la célula que produce el anticuerpo. En cualquier modalidad, cuando solamente una porción de la región constante o variable se reemplaza, el anticuerpo quimérico

20 resultante puede definir el mismo antígeno y/o tener la misma función de efecto aún sin alterar o mejorar de manera que el anticuerpo quimérico puede demostrar una mayor especificidad de antígeno, mayor constante de unión de afinidad, función de efecto aumentada, o secreción aumentada y producción por la estirpe que produce el anticuerpo transfectado, etc.

25 En otra modalidad, la invención proporciona anticuerpos completamente humanos. Los anticuerpos humanos consisten completamente de secuencias de polipéptido característicamente humanas. Los anticuerpos

humanos de esta invención pueden producirse por una amplia variedad de métodos (ver, por ejemplo, Larrick *et al.*, Patente de E.U. No. 5,001,065). En una modalidad, los anticuerpos humanos de la presente invención se producen inicialmente en células trioma (descendientes de tres células, dos humanas y una de ratón). Los genes que codifican los anticuerpos se clonan entonces y expresan en otras células, particularmente células mamíferas no humanas. El planteamiento general para producir anticuerpos humanos por tecnología de trioma se ha descrito por Ostberg *et al.*, (1983), *Hybridoma* 2: 361-367, Ostberg, Patente de E.U. No. 4,634,664 y Engelman *et al.*, Patente de E.U. No. 4,634,666. Se ha encontrado que las triomas producen anticuerpo más establemente que los hibridomas ordinarios hechos de células humanas.

Los métodos para producir y formular anticuerpos adecuados para su administración a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) se conocen bien en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos pueden proporcionarse en una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo y un excipiente farmacéutico (por ejemplo, salina). La composición farmacéutica puede incluir opcionalmente otros aditivos (por ejemplo, reguladores, estabilizadores, conservadores y lo similar). Una cantidad eficaz de anticuerpo es generalmente una cantidad eficaz para proporcionar protección contra síntomas o enfermedad Neisserial por un periodo deseado, por ejemplo, un periodo de al menos aproximadamente 2 días a 10 días o 1 mes a 2 meses).

7. Análisis de Diagnóstico

Los antígenos o anticuerpos de la invención también pueden utilizarse para propósitos de diagnóstico. Por ejemplo, los péptidos pueden utilizarse para seleccionar sueros inmunes y pre-inmunes para asegurar que la vacunación ha sido eficaz. Los anticuerpos también pueden utilizarse en

inmunoanálisis para detectar la presencia de moléculas de antígeno particulares asociadas con enfermedad *Neisserial*.

EJEMPLOS

5 Debe entenderse que los ejemplos y modalidades descritas en la presente son para propósitos ilustrativos solamente y que las diversas modificaciones o cambios en vista de los mismos se sugerirán a personas expertas en la materia y se incluirán dentro del espíritu y resumen de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones anexas. Todas las publicaciones,
10 patentes y solicitudes de patente citadas aquí se incorporan en la presente para referencia en su totalidad para todos los propósitos.

A. Preparaciones de Membrana

Las cepas para la preparación de OMVs y MVs se seleccionan en la base de serogrupo, serotipo y serosubtipo. Las cepas a utilizarse en la
15 preparación de MVs se seleccionan para niveles relativamente elevados de burbujeo y expresión de NspA (ver Moe *et al.*, (1999 Infect. Immun. 67:5664). Las cepas ejemplificativas utilizadas en la preparación de OMVs y MVs se han depositado con la American Type Culture Collection (ATCC, ver abajo). Las cepas que producen niveles elevados de burbujas, tales cepas son
20 particularmente útiles en la producción de MV, pueden seleccionarse o se conocen en la materia (ver, por ejemplo, WO 01/34642).

La cepa meningococal congelada a -80°C en -2% de leche descremada acuosa (p/v) se subcultiva en una placa de agar de chocolate comercial (Remel, Lantakas, KS). Después de crecimiento durante la noche a
25 37°C en 4% de CO_2 , varias colonias se seleccionan para inocular ~ 7 ml de caldo Mueller-Hinton estéril a un $\text{OD}_{620\text{nm}}$ de 0.1. El cultivo se incuba a 37°C , 4% de CO_2 con sacudida hasta que el $\text{OD}_{620\text{nm}}$ alcance 0.6-0.8 (dos a tres

horas). Dos a tres cultivos iniciales de 7 ml se utilizan entonces para inocular 500 ml de caldo Mueller-Hinton. El cultivo más grande se desarrolló a un OD_{620nm} de 0.9-1.0 a 37°C con agitación vigorosa. Se agrega fenol al cultivo a una concentración final de 0.5% (p/v) y la mezcla se deja a 4°C durante la
5 noche para inactivar las bacterias. Las células se forman en bolitas mediante centrifugación (11,000 x g) por 30 min. a 4°C. Las bolitas celulares se congelan a -20°C hasta que se utilizan para la preparación de vesículas de membrana de proteína de membrana exterior (OMV).

Las microvesículas (MV) se recolectan del sobrenadante de cultivo
10 celular tratado con fenol al agregar sulfato de amonio sólido (390 g/l de concentración final) lentamente con agitación. Después de que sulfato de amonio se agrega y disuelve completamente, la mezcla se deja a 4°C durante la noche. MVs precipitadas se recolectan entonces mediante centrifugación a 11,000 x g por 30 min. La bolita de MV precipitada se resuspende en 0.04
15 volumen de PBS y se centrifuga de nuevo a 16,000 x g por 15 min a 4°C. La bolita se descarta y las MVs, que permanecen en el sobrenadante, se recolectan por centrifugación a 100,000 x g por 2 hrs a 4°C. La bolita final se resuspende en 0.01 volumen (es decir, 5 ml por 500 ml de cultivo) de agua (preparación de vacuna "MV"). Alternativamente, la bolita se resuspende en 0.1
20 M de Tris•HCl, pH 8.6, que contiene 10 mM de EDTA y 0.5% (p/v) de deoxicolato de sodio (~ 3ml/500 ml de cultivo celular). Después de agitar (30 min), la mezcla se centrifuga (125,000 x g, 2 hrs, 4°C). El sobrenadante se descarta y la bolita resuspende en 1 ml de 3% de sucrosa (preparación de vacuna "DOC MV"). La concentración de proteína de las preparaciones MV y
25 DOC MV se determina por análisis BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Las suspensiones MV y DOC MV se congelan entonces en hielo seco y almacenan a -20°C hasta que se utilizan para inmunización.

Vesículas de membrana exteriores (OMV) se preparan por el método de Zollinger *et al.*, (1979 *J. Clin. Invest.* 63:836-848). La bolita celular congelada se resuspende en 10 ml de 0.05 M de regulador Tris•HCl, pH 7.4 que contiene 0.15 M de NaCl y 0.01 M de EDTA, se calienta entonces a 56°C por 30 min, seguido por enfriamiento en hielo. La suspensión celular se sonica entonces en hielo con varias explosiones de 15 segundos utilizando sonificador de microsonda (Branson, Danbury, CT). Los residuos celulares se remueven mediante centrifugación a 16,000 x g por 15 min, y las vesículas de membrana exteriores (OMVs) en el sobrenadante se obtienen mediante ultracentrifugación a 100,000 x g por 2 hrs a 4°C. La bolita OMV se resuspende en 2 ml de agua (preparación de vacuna "OMV"). Alternativamente, la bolita de célula congelada se resuspende en 0.1M Tris•HCl, pH 8.6, que contiene 10 mM de EDTA y 0.5% (p/v) de deoxicolato de sodio. Después de agitar por 30 min, a temperatura ambiente, la mezcla se centrifuga (20,000 x g, 30 min, 4°C). El sobrenadante se retiene y la bolita se reextrae y centrifuga de nuevo con un tercer volumen del mismo regulador. Los sobrenadantes de ambas extracciones se combinan y centrifugan (125,000 x g, 2 hrs, 4°C). El sobrenadante y la bolita se resuspende en 5 ml de 3% de sucrosa (preparación de vacuna "DOC OMV"). Las preparaciones de vacuna OMV y DOC OMV se congelan en hielo seco, y almacenan a -20°C hasta que se utilizan para inmunización. La concentración de proteína de las preparaciones OMV y DOC OMV se determina por BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

8. Programa de Inmunización

Las preparaciones MV u OMV se diluyen en PBS y ya sea se mezclan con un volumen igual de adyuvante de Freund completo (CFA; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) o hidróxido de aluminio (Alhydrogel 1.3% de Superfos Biosector, Frederikssund, Dinamarca), o fosfato de aluminio

(Alhydrogel que se ha incubado con regulador PBS por al menos 3 hrs). En algunas preparaciones de vacuna, los nucleótidos CpG (5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3'(SEQ ID NO:1) Chiron Corp., Emeryville, CA) se agregan a la mezcla de fosfato de aluminio/antígeno a una concentración final de 100 µg/ml como un segundo adyuvante. Los ratones se inmunizan por vía IP (CFA) o SC (fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio) con 100 µl que contienen entre 5 a 25 microgramos de proteína total de la MV preparada de la cepa meningococal RM1090. En intervalos de 3 a 4 semanas dos dosis de inyección de refuerzo subsecuentes (5-25 microgramos/ratón) se dan con ya sea adyuvante de Freund incompleto (IFA), o hidróxido de aluminio, o fosfato de aluminio (preparado como se describe arriba) por las vías IP o SC, respectivamente, o primeras MVs preparadas de cepa meningococal BZ198 y después OMVs preparadas de cepa meningococal Z1092. La inmunización secuencial con tres diferentes cepas meningococales, que son genéticamente diferentes con respecto a su serogrupo, serotipo, y serosubtipo y otros antígenos, constituye lo que de aquí en adelante se designará "vacuna CHORI". En un segundo experimento, otro grupo de ratones se inmunizan con vacuna CHORI como se describe arriba excepto que oligonucleótidos CpG no se utilizan como un segundo adyuvante y el experimento incluyó ratones a los que se les da la vacuna CHORI combinada con adyuvante de hidróxido de aluminio y ratones a los que se les dan tres inyecciones de una mezcla de MV/OMV descrita arriba junto con fosfato de aluminio. En un tercer experimento, a los grupos de conejillos de Indias se les dan ya sea inmunizaciones secuenciales con antígenos de vacuna CHORI o tres inyecciones de una mezcla de antígenos de vacuna CHORI combinados con fosfato de aluminio.

C. SDS-PAGE y Western blots

Las preparaciones de proteína se analizan utilizando 15% SDS-

PAGE como se describe por Laemmli (1970 *Nature* 227:680-685) que emplean un aparato de electroforesis Mini-Protean II (BioRad, Richmond, CA). Las muestras se suspenden en regulador de muestra SDS (0.06 M Tris•HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol, 10 microgramos/ml bromofenol azul) y opcionalmente se calientan a 100°C por 1 min, antes de cargarse directamente en el gel.

La figura 2 muestra un gel de 15% SDS-PAHE coloreado con Coomassie de las proteínas presentes en la MV de cepa Z1092 (vía 2) o preparaciones OMV de cepa Z1092 (vía 4), o las preparaciones respectivas después de haber extraído con 0.5% (p/v) de deoxicolato de sodio (es decir DOC MV [vía 3] y DOC OMV [vía 5]) como se describe por Fredricksen *et al.*, (1991, *NIPH Ann.* 14:67-79). Las cuatro preparaciones correspondientes hechas de cepas meningococales BZ198 y RM1090 (se muestran en las vías 6 a 13, respectivamente). Cinco proteínas, PorA, PorB, Rmp, Opa, y Opc, se conocen por constituir las proteínas de membrana exterior *Neisseria meningitidis*. Todas las preparaciones parecen contener las proteínas de membrana exterior principales PorA y PorB (~39-42 kDa) y las proteínas de opacidad, Opa y Opc (~28-31 kDa), aunque la masa aparente de las proteínas particulares y cantidades relativas fueron diferentes en cada preparación. La proteína menos distinta que contiene una masa aparente de ~31-34 kDa en las preparaciones DOC OMV puede ser la proteína modificable de reducción (Rmp). Además de las proteínas de membrana exterior principales, cada preparación MV y OMV contiene varias otras proteínas en cantidades menores. En general, las proteínas menores son más variables entre las cepas y entre MV en comparación con las preparaciones OMV.

D. Unión de anticuerpo a la superficie celular

La unión de anticuerpos a la superficie de bacteria viva se

determina por citometría de flujo de fluorescencia indirecta (Granoff *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 160:5028-5036). Las células bacterianas crecen fase mid-log en caldo Mueller-Hinton, recolectan por centrifugación, y resuspenden en regulador de bloqueo (PBS que contiene 1% (p/v) de albúmina de suero de bovino (BSA) y 0.4% (p/v) de azida de sodio) a una densidad de $\sim 10^8$ células por ml. Las diluciones de prueba o antisuero de control (típicamente 1:20, 1:200, 1:2000) se agregan entonces y dejan unir a las células, que se mantienen en hielo por 2 hrs. Después de dos enjuagues con regulador de bloqueo, las células se incuban con IgG de anti-ratón de cabra (H+L) de fragmento conjugado F(ab')₂ con FITC (Jackson Immune Research, West Grove, PA) por 1 hr. Las células se enjuagan dos veces con regulador de bloque después se reaccionan con 0.25% de formaldehído en regulador PBS antes de analizar las células bacterianas por citometría de flujo.

Los anticuerpos de control positivo incluyeron anticuerpos monoclonales de serosubtipificación o serotipificación específica de meningococal (MN2C3B, MN16C13F4, Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu, Biltoven, Países Bajos) y SEAM 12, un anticuerpo monoclonal anti-polisacárido que es específico para cepas de serogrupo B encapsuladas (Granoff *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 160:5028). El control negativo consistió de un anticuerpo monoclonal IgG de ratón (VIG10) de especificidad relevante y sueros policlonales de ratones inmunizados con proteínas de membrana de *E. coli*. Los anticuerpos utilizados para definir el serogrupo, serotipo y serosubtipo se proporcionan en las Figuras 20 y 21.

La figura 3 muestra los resultados de un experimento típico que examina la unión del anticuerpo a dos cepas de prueba: MC58 y S3446. Ambas cepas expresan proteína PorA y PorB que son heterólogas con la proteína s de porina respectiva de las tres cepas utilizadas para preparar la vacuna CHORI.

Los antisueros de ratones inmunizados con antígeno CHORI muestran un incremento en intensidad de fluorescencia con ambas cepas cuando los antisueros se prueban en diluciones de 1:20 a 1:200. En contraste, los antisueros policlonales preparados para proteínas precipitadas de sobrenadante de cultivo de *E. coli* muestran solamente fluorescencia antecedente de baja intensidad (1:20 dilución), y se consideran negativos. Los antisueros de conejillos de Indias inmunizados con la vacuna Noruega, preparada de OMV de cepa 4HH/76 (P1.7,16), fueron positivos contra la cepa MC58 con un serosubtipo PorA homólogo (P1.7,16) pero fueron negativos cuando se probó en 1:20 dilución contra cepa S3446 con un serosubtipo heterólogo (P1.22,14).

Como se resume en la Figura 4, de las 12 cepas de serogrupo B de *N. meningitidis* probadas por citometría de flujo, 11 (92%), incluyendo 6 cepas con serosubtipos PorA heterólogos, y 3 cepas teniendo tanto serosubtipos como serotipos heterólogos, fueron positivas para toda la unión de superficie celular por antisuero de antígeno anti-CHORI. Una cepa negativa no expresa PorA, que sugiere que algunos de los anticuerpos de vacuna anti-CHORI se une a PorA o a proteínas cuya expresión puede regularse junto con expresión PorA. Además de las 11 cepas meningococales B, los antisueros de vacuna anti-CHORI fueron positivos también en este análisis cuando se prueba con cepas meningococales de serogrupo A (Z1073) y C (60E) (Figura 5).

E. Actividad del anticuerpo bactericida dependiente de complemento

El análisis bactericida se adapta del método previamente descrito por Mandrell *et al.*, (1995 *J. Infect. Dis.* 172:1279-1289). Descubriendo que una vacuna produce anticuerpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* se acepta en el campo como predicción del efecto protector de la vacuna en humanos Goldschneider *et al.*, 1969, *J. Exp. Med.* 129:1307; Borrow *et al.*, 2001

Infect Immun. 69:1568). Después del crecimiento durante la noche en ágar de chocolate, varias colonias se inoculan en caldo Mueller-Hinton (A_{620nm} inicial de ~0.1) y el organismo de prueba se desarrolla por aproximadamente 2 hrs a un A_{620nm} de ~0.6. Después de enjuagar la bacteria dos veces en regulador de Gey

5 que contiene 1% BSA (p/v), aproximadamente 300 a 400 unidades que forman la colonia (CFUs) se agregan a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción final de 60 microlitros contuvo 20% (v/v) de complemento, y diluciones de 2 veces seriales de suero total o anticuerpos monoclonales de control en regulador de Grey. La fuente de complemento fue suero humano de un adulto

10 saludable sin anticuerpo anticapsular detectable a polisacárido de grupo B cuando se prueba por ELISA (Granoff *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 160:5028-5036), y no actividad bactericida intrínseca detectable contra la cepa de prueba a una concentración final de 20 o 40%. En experimentos preliminares con un panel de suero de prueba, esta fuente de complemento da concentraciones

15 bactericidas comparables como aquellas obtenidas con suero agamaglobulinémico como la fuente complemento. Las concentraciones bactericidas de suero se definen como la dilución de suero (o concentración de anticuerpo) que resulta en un 50% de reducción en CFUs por ml después de 60 min, incubación de bacterias en la mezcla de reacción, en comparación con

20 CFU de control por ml en tiempo 0. Típicamente, las bacterias incubadas con el anticuerpo de control negativo y complemento mostraron un incremento de 150 a 200% en CFU/mL durante los 60 min de incubación. La Figura 6 muestra datos de un experimento típico con cepa meningococal B 2996 probada con un mAb capsular anti-meningococal B (SEAM 12, Granoff *et al.*, 1998, *J. Immunol.*

25 160:5028-5036), antisueros de control de conejillo de Indias y ratón, NspA anti-recombinante de ratón y antisueros de antígeno anti-CHORI, y antisueros de vacuna anti-Noruega de conejillo de Indias.

La Figura 7 resume los resultados de medición de actividad bactericida mediada por complemento de los antisueros de antígeno anti-CHORI a cada cepa meningococal B probada. Todas las 12 cepas se mueren por complemento junto con concentraciones similares de un mAb anti-capsular de control positivo (SEAM 12; subtipo IgG2a (Granoff *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 160:5028-5036). De manera similar, todas las 11 cepas fueron positivas para antisueros anti-CHORI que se unen por el análisis de flujo fueron susceptibles a bacteriolisis mediada por complemento inducida por el anticuerpo (a una 1:10 dilución o más elevada, cada una mostró más de 50% de muerte, en comparación con CFU/ml presente en el tiempo 0). También, las cepas A y C meningococales heterólogas que fueron positivas cuando se prueban en el análisis de flujo también fueron positivas en el análisis bactericida (Figura 5). De nuevo, solamente la cepa M136, que no expresa PorA, y fue negativa para unión de anticuerpo en el análisis de flujo, fue resistente a la muerte en el análisis bactericida. En contraste, los anticuerpos producidos por ya sea la vacuna Noruega o rNspA, ambos de los cuales son candidatos de vacuna meningococal B que actualmente se prueban en humanos, fueron capaces de activar la bacteriolisis mediada por complemento con solamente un número limitado del conjunto genéticamente diverso de cepas. Como con el análisis de flujo, los antisueros de vacuna anti-NspA y los antisueros de vacuna anti-Noruega son bactericidas contra solamente un número limitado de las cepas.

La Figura 8 resume los resultados de probar la actividad bactericida mediada por complemento de antisueros anti-CHORI preparados en un segundo experimento en ratones. Los datos se muestran para antisueros preparados con vacuna CHORI dada con CFA o fosfato de aluminio (sin CpG). Los resultados se muestran para las 14 cepas meningococales B probadas en este experimento (8 con serosubtipos heterólogos a aquellos de las cepas de

vacuna). Los resultados se muestran para una cepa MenB adicional en la cual el gen que codifica NspA se ha inactivado (BZ198ΔNspA). Todas las 15 cepas se matan por antisueros anti-CHORI (14/15 con vacuna CHORI dada con CFA; y 13/15 con vacuna CHORI dada con fosfato de aluminio; para las cepas heterólogas, 6/7 y 5/7, respectivamente). En contraste, solamente 1 de 15 cepas se matan por antisueros de animales de control dan 3 inyecciones de MV de *E. coli*. Estos resultados de un segundo experimento en ratones confirman los resultados anteriores obtenidos con la vacuna CHORI en el experimento 1. Además, los datos indican que el segundo adyuvante, oligonucleótidos CpG, que no se utiliza en el segundo experimento, no se necesita por la vacuna CHORI para producir ampliamente anticuerpo reactivo.

Un grupo de ratones en el segundo experimento recibió tres inyecciones, cada uno consistiendo de una mezcla de la misma MV, MV y OMV utilizadas en la inmunización secuencial. Los antisueros resultantes son bactericidas contra 12 de las 15 cepas (4 de 7 de las cepas heterólogas). La inmunización con la mezcla de antígenos produjo actividad bactericida más amplia que la esperada pero las concentraciones medidas contra algunas cepas tienden a ser mucho más baja que aquellas obtenidas en animales a los que se les da la inmunización de vacuna CHORI secuencial (por ejemplo, CU385 y 1000, concentraciones de 1:128 y 1:128 después de la vacuna CHORI/fosfato de aluminio vs. concentraciones de <1:4 y 1:6 en antisueros preparados contra tres inyecciones de los antígenos mezclados/fosfato de aluminio)..

En un tercer experimento, los grupos de conejillos de Indias se inmunizan con vacuna CHORI dada con fosfato de aluminio (sin CpG), o hidróxido de aluminio (sin CpG). Los resultados se muestran en la Figura 9 para 9 cepas meningococales B probadas (5 con serosubtipos heterólogos a aquellos de las cepas de vacuna), y para una cepa MenB adicional en la cual el

gen que codifica NspA se ha inactivado (BZ198ΔNspA). 9 de las 10 cepas se matan por antisueros anti-CHORI vs. 0 de 10 cepas muertas por antisueros de animales de control a los que se les dan 3 inyecciones de MV de *E. coli*. De esta manera, la vacuna CHORI produce respuestas de anticuerpo bactericida en base a amplio en conejillos de Indias, un segundo modelo animal que puede ser más predecible de respuestas de anticuerpo protector en humanos que en ratones.

F. Protección pasiva del animal

Un criticismo de análisis bactericidas es que prueba la actividad de anticuerpos contra bacterias crecidas en caldo, y que las bacterias crecidas *in vivo* pueden tener propiedades diferentes. Por lo tanto, la habilidad del antisuero anti-CHORI de ratón para conferir protección pasiva contra bacteremia grupo B *N. meningitidis* se prueba en ratas infantiles probados con IP, utilizando un moldeo aceptado y método adaptado de Saukkonen *et al.*, (*J. Infect. Dis.*, 1988, 158:209-212), que se considera en el campo como siendo predecible de resultados en humanos. La cepa 8047 meningococal B, que fue positiva por el análisis citométrica de flujo para epítomos accesibles de superficie de antígeno CHORI y susceptibles a actividad bactericida del antígeno anti-CHORI, se selecciona para este estudio. Los cachorros infantiles (6 a 7 días de edad) de seis camadas de ratas Wistar multiplicadas por raza (Charles River, Hollister, CA) se redistribuyen aleatoriamente a las madres en crianza. Los grupos de cinco a seis animales se preparan con IP con 100 µl de aproximadamente 5×10^3 CFU de la cepa 8047 de grupo B. La cepa utilizada se ha pasado tres veces en ratas infantiles. La bacteria aislada de cultivos sanguíneos después del tercer paso se desarrolló tres veces agar de chocolate durante la noche y se almacenó congelada a -70°C en frascos que contienen leche descremada estéril. El día del experimento, las bacterias se

desarrollaron, lavaron y resuspendieron en regulador PBS que contiene 1% BSA como se describe arriba para el análisis bactericida.

A los animales se les da antisueros o anticuerpos diluidos en PBS que contiene 1% BSA por inyección IP 2 hrs. antes de la preparación bacteriana. Dieciocho horas después de la preparación bacteriana, los especímenes sanguíneos se obtienen al perforar el corazón con una jeringa y aguja que contiene una a dos gotas de 25 Unidades/ml de heparina sin conservador (Fujisawa USA, Deerfield, IL). Aliquotas de 1, 10 y 100 microlitros de sangre se colocan en agar de chocolate. CFU por ml de sangre se determina después de incubación durante la noche de las placas a 37°C en 5% de CO₂.

La Figura 10 resume los resultados de cultivos bacterianos cuantitativos realizados en especímenes sanguíneos obtenidos 18 hrs después de preparación. Una dosis de 10 microgramos por rata del anticuerpo anticapsular de control positivo, SEAM 3, es completamente protector contra la cepa como lo fue los antisueros anti-CHORI de ratón en una dilución de 1:20). En contraste, los antisueros de vacuna anti-Noruega de conejillo de Indias (1:20) y los dos sueros de control (antisueros de ratón preparados a proteínas *E. coli* o antisueros de conejillo de Indias de animales inmunizados con alum sola) no fueron capaces de proteger contra bacteremia causada por cepa 8047.

En un segundo experimento de protección pasiva utilizando el procedimiento arriba descrito, los antisueros de vacuna anti-CHORI preparados en conejillos de India también muestran proteger ratas infantas de bacteremia meningococal B después de preparación IP (Figura 11). La protección se observa en animales tratados con antisueros preparados para vacuna administrada con fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio, y fue superior a la protección observada en animales de control tratados con 20 µg de un

anticuerpo monoclonal anticapsular de murino (SEAM 3).

G. Inmunoprecipitación de antígenos de superficie reconocidos por anticuerpos de antígeno anti-CHORI

El método utilizado para inmunoprecipitación de antígenos
5 accesibles de superficie se basa en aquellos descritos por Hansen *et al.*, (1981 *Infect. Immun.* 33: 950-953) y Gulig *et al.*, (1982 *Infect. Immun.* 37:82-88). En nuestros estudios, el método se utiliza con ya sea células sin marcar, o con células en las cuales las proteínas de superficie se han radioyodinado. Las células se desarrollan en caldo Mueller-Hinton (~7 ml) a un OD de 0.6 y
10 recolectaron mediante centrifugación a 5000 x g a 4°C. La bolita celular se lava dos veces en PBS frío que contiene 1% BSA o, para el análisis de radioinmunoprecipitación, PBS solo.

Las células a yodinarse se transfieren a un tubo de vidrio. Un nanomole de KI y 1 mCi de Na¹²⁵I (Amersham) se agregan a la suspensión
15 celular. La radioyionización se inicia por la adición de 0.03% de H₂O₂ (50 µl) y lactoperoxidasa (Sigma, St. Louis, MO) en agua (50 µl de una solución de 1 mg/ml). Las mismas cantidades de H₂O₂ y lactoperoxidasa se agregan en intervalos de 4 min. por 12 min. La reacción se termina después de 16 min al agregar la mezcla de reacción a PBI frío (20 ml) (es decir NaI substituido para
20 NaCl en PBS). Las células se recolectan por centrifugación (5,000 x g, 10 min, 4°C), lavaron 2 veces con PBS, después se utilizaron inmediatamente.

Las células se resuspenden en PBS (2 ml) que contiene 1% BSA. Los antisueros se agregan a alícuotas de 0.5 ml de suspensión celular. La mezcla se incuba con sacudida por 90 min. a 4°C. Las células se recolectan
25 entonces por centrifugación (1 min. de giro en microfuga), lavan dos veces con PBS/1% BSA y resuspenden en 1 ml de regulador de solubilización (50 mM de regulador Tris, pH 7.8, que contiene 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de

Triton X-100, 0.2% de deoxicolato de sodio, y 0.1% de sulfato de dodecilo de sodio. Después de la incubación por 60 min. a 37°C, el material insoluble se remueve por centrifugación (45,000 x g por 60 min. a 20°C). Los sobrenadantes se transfieren entonces a tubos que contienen 3-4 miligramos de perlas de Sepharose de proteína A (Sigma) pre-equilibradas con 50 µl de PBS. Las muestras se incuban durante la noche a 4°C con sacudida. Las perlas se lavan cinco veces con regulador de solubilización. Las proteínas unidas se liberan de las perlas al agregar 75 µl de regulador muestra de SDS y calienta a 100°C por 1 min. Después de remover el sobrenadante, 1 µl de 2-mercapto etanol se agrega a cada muestra y después se calienta de nuevo a 100°C por 1 min. Las muestras se pasan entonces en un gel de 15% SDS-PAGE y se colorearon utilizando color plata (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

Para Western blots, el gel se equilibra con regulador (48 mM Tris•HCl, 39 mM glicina, pH 9.0, 20% (v/v) metanol) y las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) utilizando una célula de transferencia electroforética Trans-Blot™ (Bio-Rad) semi-seco. Las membranas de nitrocelulosa se bloquean con 2% (p/v) leche descremada en PBS que contiene 0.2% (p/v) azida de sodio. Los antisueros se diluyen en el mismo regulador de bloqueo que contiene 0.1% Tween-20. El anticuerpo unido se detecta utilizando IgG anti-ratpon de conejo, anticuerpo policlonal de conjugado A,M-alcalina (Zymed, South San Francisco, CA) diluido en PBS que contiene 1% (p/v) BSA, 1% (p/v) Tween-20 y 0.2% (p/v) azida de sodio y substrato Sigma Fast™ BCIP/NBT (Sigma).

La Figura 12 es un gel SDS coloreado con plata que demuestra las proteínas de superficie celular precipitadas con los antisueros anti-CHORI (Vía 2) de M7, un mutante no encapsulado de cepa de serogrupo B, NMB (Stephens *et al.*, 1991, *Infect. Immun.* 59. 4097-4107), seis proteínas teniendo masas

aparentes de 59.5, 40.7, 39.6, 33, 27.9 y 14.5 kDa se precipitan por los antisueros preparados para el antígeno CHORI (Vía 2) pero no por antisueros de proteína anti-*E. coli* de control (Vía 3). Los mismos resultados se obtienen cuando los antisueros de antígeno anti-CHORI se utilizan para precipitar
5 proteínas de superficie de la cepa origen encapsulada, NMB (datos no mostrados). Excepto para 59.5 y 27.9 kDa de proteínas Ig de cadena ligera y pesada (ver abajo), las mismas proteínas de superficie detectadas por coloración de plata se observan también en células marcadas con ¹²⁵I (datos no mostrados).

10 De observarse, no hubo lipooligosacárido (LOS), que se detectaría por coloración de plata, que se precipita por los antisueros de antígeno anti-CHORI. Los experimentos adicionales, descritos abajo, se diseñan para determinar si la unión de superficie observada y actividad biológica protectora de antisueros de vacuna anti-CHORI se debe a anticuerpos anti-LOS.

15 La Figura 13 muestra una Western blot de las mismas muestras como se resuelve en el gel SDS en la Figura 12. Las muestras en las vías 1 a 3 se detectan por antisueros de vacuna anti-CHORI. Las muestras en las vías 4 a 6 se detectan por mAb específica de anti-PorA P1.2. Las proteínas que tienen masas aparentes de 59.5 y 27.9 kDa en la Figura 13, (Vías 2, 3, 5 y 6)
20 corresponden a cadenas, pesada y ligera, de anticuerpo, respectivamente, a medida que se detectan con anticuerpo secundario de conjugado de fosfatasa alcalina Ig anti-ratón de conejo. La proteína de 40.7 kDa precipitada por los antisueros de antígeno anti-CHORI (Figura 12, Vía 2) fue reactiva con el anticuerpo específico anti-PorA P1.2 en la Western (Figura 13, Vía 5) y , por lo
25 tanto, es PorA P1.2. Como se espera, PorA P1.2 también se detecta en la proteína total de M7 (Figura 13, Vía 4). Los antisueros de vacuna anti-CHORI detectaron solamente la proteína de 33 kDa (Vía 2) y no PorA. De esta manera,

los antisueros preparados al antígeno CHORI reaccionan tanto con proteína de 33 kDa desnaturalizada y nativa pero solamente las formas nativas de las proteínas de 40.7, 39.6 y 14.5 kDa presentes en la superficie celular de la cepa M7 (Figura 12, vía 2).

5 Los experimentos de inmunoprecipitación similares se realizan en las preparaciones de MV y OMV utilizadas para inmunización y siete cepas de serogrupo B encapsuladas, genéticamente diversas. Los resultados se resumen en la Figura 14. Cuando los resultados se comparan, es aparente que la inmunización secuencial con vesículas de membrana de tres cepas
10 meningococales genéticamente diversas produce anticuerpos que reconocen una variedad de antígenos. Algunos de los antígenos que se reconocen son los mismos en todas las cepas; otras son cepas específicas o comunes a subconjuntos de cepas. Por ejemplo, las proteínas que tienen masas aparentes de 37-41 kDa se precipitan de las cepas BZ198 y NMV pero no de cualquiera de
15 otras cepas. De manera similar, las proteínas que tienen una masa aparente de 25.7 kDa se precipitan de cepas NG3/88 y S3446 pero de cualquier otra cepa. Sin embargo, existe una proteína de superficie que tiene una masa aparente de 32 a 33 kDa que se reconoce por antisueros de antígeno anti-CHORI en todos los ejemplos excepto para la cepa M136, que fue negativa tanto en análisis
20 bactericida como flujo. La proteína de 32 a 33 kDa puede ser un antígeno conservado.

Los experimentos adicionales se realizan en cepas de serogrupo B encapsuladas. CU385, BZ198 y 1000 utilizan células en las cuales las proteínas de superficie se han radioyodinado (Figura 14A) y precipitado con
25 antisueros inmunes de diferentes grupos de ratones dando la vacuna CHORI. Además de las proteínas arriba descritas, en este segundo conjunto de experimentos, las proteínas con masas moleculares aparentes entre 10 y 14.5

kDa, y 80 kDa se precipitan de cepas CU385 y BZ198. Tres proteínas con kDa aparente de 26, 41 y 45 se precipitan de la cepa 1000.

Es importante observar que no todos los antígenos reconocidos por los antisueros de ratones inmunizados con antígeno CHORI se inmunoprecipitan de las células bacterianas. También existen anticuerpos en los antisueros para algunos antígenos (por ejemplo, la proteína NspA) que se muestra que están presentes por una ELISA o Western blot, pero no se inmunoprecipitan en este experimento. La falla para detectar estos otros antígenos puede resultar del hecho de que el complejo de anticuerpo/antígeno debe ser estable en la presencia de detergentes (Triton X-100, deoxicolato, y sulfato de laurilo) a detectarse.

H. Detección de proteínas reactivas en preparaciones de MV y OMV de vacuna CHORI con anticuerpos de vacuna anti-CHORI producidos en ratones y conejillos de Indias.

La Figura 15 muestra una Western blot de MVs de cepas RM1090 (C:2a:P1.5,2:63,7), y BZ198 (B:NT:P1.4) y OMV de cepa Z1092 (A:4:P1.10). Los antisueros de ratones inmunizados con vacuna CHORI combinados con CFA, o a los que se les da adyuvante de fosfato de aluminio, o de conejillos de Indias inmunizados con vacuna CHORI junto con adyuvante de fosfato de aluminio, se utilizan como el anticuerpo de detección primario. La blot muestra que la vacuna CHORI produce anticuerpos que son reactivos con varias proteínas que tiene masa molecular aparente similar en cada una de las preparaciones de OMV o MV independientes de las especies animales o adyuvante utilizado en la vacuna. Las masas moleculares aparentes de todas las proteínas en las preparaciones de MV u OMV que son reactivas con anticuerpos producidos por inmunización con vacuna CHORI se resumen en la Figura 16.

I. Detección de actividad del anticuerpo anti-LOS

Uno de los determinantes antigénicos en la superficie del meningococci que se ha observado que produce anticuerpos bactericidas es lipooligosacárido (LOS). Con objeto de determinar si los anticuerpos anti-LOS se producen por la vacuna CHORI, una columna de afinidad LOS se prepara y utiliza para absorber los anticuerpos anti-LOS en los antisueros de vacuna anti-CHORI utilizando los métodos descritos por Shenep *et al.*, (1982, *J. Infect. Dis.* 145:181-190) con las siguientes modificaciones. LOS se prepara de cada cepa de vacuna por el método de Appicella *et al.*, (Bacterial Pathogenesis (1997) V.L. Clark and P. M. Bavoil eds. Academic Press, San Diego, CA), y se conjuga con BSA como sigue. LOS (1 mg) se combina con BSA (2 mg) en 100 mM regulador MES, pH 5.0. EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida HCl; 100 µl de una solución de 10 mg/ml en agua) se agrega con agitación seguida por la incubación a temperatura ambiente por 2 hrs. Una mezcla igual de los tres conjugados LOS-BSA (conjugado de 1 mg de LOS-BSA por ml de gel hidratado) se acopla a perlas de agarosa activadas por CNBr (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en regulador de carbonato de sodio (0.1 M, pH 8.0) durante la noche a temperatura ambiente.

Después del retiro de anticuerpos anti-LOS al pasar la vacuna anti-CHORI y antisueros de antígeno mezclados anti-CHORI a través de la columna de afinidad LOS, los antisueros se concentran a su volumen original por ultrafiltración y prueba por la presencia de anticuerpo anti-LOS por ELISA y actividad bactericida mediada por complemento contra dos cepas MenB (BZ198 y S3032). Como se resume en la Figura 17, la presencia de anticuerpo anti-LOS se reduce grandemente o elimina por absorción con la columna de afinidad del conjugado LOS-BSA. Como se muestra en la Figura 18, hubo poca o nada de diferencia en las concentraciones bactericidas entre los sueros absorbidos y

no absorbidos de ratones o conejillos de Indias inmunizados con vacuna CHORI que indica que el anticuerpo anti-LOS no contribuye significativamente a la actividad bactericida contra ya sea una cepa de vacuna (BZ198) o cepa S3032, que tiene PorA y PorB que son heterólogas a las cepas utilizadas para preparar la vacuna. Existe un mayor efecto en las concentraciones bactericidas de antisuero preparadas de ratones y conejillos de Indias inmunizados con vacuna CHORI mezclada que indica una contribución más significativa de anticuerpos anti-LOS a la concentración bactericida en estos antisueros.

J. Preparación de anticuerpos monoclonales

Los ratones CD1 hembra (Charles River, Hollister, Calif) se vacunan secuencialmente con MV preparada de cepa meningococal RM1090 (C:2a:P1.5,2), BZ198 (B:NT:7,4) y OMV de cepa Z1092 (A:4,21:P1.10). A los ratones se les dan tres inyecciones de 100 microlitros, cada una separada por tres semanas, que contienen 5 microgramos de proteína. Las primeras dos dosis se dan subcutáneamente junto con fosfato de aluminio (0.5% pes/vol) y la dosis final se da subcutáneamente sin adyuvante y administra intraperitonealmente (i.p.). Tres días después, los animales se sacrifican y sus células de bazo se fusionan con células de mieloma (P3X63-AG8.653) en una proporción de 1 célula de bazo a 1.74 célula de mieloma. Después de dos semanas de incubación en medio HAT selectivo, los sobrenadantes de hibridoma se selecciona para actividad de unión de anticuerpo por ELISA de célula completa utilizando cepas MenB ecanpsuladas 1000 y CU3885 como el antígeno objetivo. El método descrito por Abdillahi and Poolman, (Microb Pathog, 1988 4:27-32) se utiliza para el análisis ELISA de célula completa. Los hibridomas que secretan el anticuerpo que fue reactivo con tanto cepas 1000 como CU385 y en una ELISA de célula completa y fue positivo para su unión por citometría de flujo se clona al limitar la dilución y después se expande y

congela para uso subsecuente en cultivo de tejido.

Los anticuerpos de ocho estirpes se caracterizan en detalle. Las subclases de los anticuerpos monoclonales se determinan utilizando una ELISA de captura de anticuerpo y anticuerpo policlonal conjugado de fosfatasa alcalina específico para cada una de las subclases de IgG de ratón, IgM, IgA, cadenas ligeras κ y λ (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Ala.). Los anticuerpos monoclonales producidos por los clones de hibridoma se recolectan de medio de cultivo de tejido por precipitación de sulfato de amonio (55% p/vol). La concentración de mAb purificada se determina por ELISA de captura utilizando estándares Ig como se recomienda por el fabricante (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Ala.).

K. Reactividad de mAbs de antígeno anti-CHORI con cepas MenB diversas.

La habilidad de mAbs preparadas de ratones inmunizados con antígeno anti-CHORI (administrado con CFA o fosfato de aluminio) para unirse a cepas MenB diversas se determina por ELISA de célula completa (Abdillahi and Poolman, Microb Pathog, 1988 4:27-32). Los resultados se resumen en la Figura 19. Ninguno de los anticuerpos policlonales reacciona con LOS preparados de las cepas de inmunización. Los mAbs 1D9 y 14C7 son reactivos con antígenos en todas o casi todas las cepas meningococales probados pero no con ninguna cepa no neisserial. MAb 14C7 es específico para la proteína NspA de superficie Neisserial altamente conservada ya que es reactiva con rNspA expresada en *E. coli*. Este mAb también es reactivo con cepas 8047 y BZ198 pero no es reactivo con las cepas correspondientes en las cuales el gen NspA se ha inactivado. En contraste a los anticuerpos ampliamente reactivos, los antígenos reconocidos por los mAbs 4B11 y 9B6 se limitan a ciertas cepas. Observe que MAb 4B11 es reactivo con la cepa 8047 pero no con el mutante

8047 correspondiente en el cual el gen NspA se ha inactivado. Sin embargo, mAb 4B11 no se une a rNspA expresado en vesículas *E. coli*, y también no se une a cepa BZ198, que se conoce que sobreexpresa naturalmente (ver Moe *et al.*, 1999 Infect. Immun. 67:5664; Moe *et al.*, Infect Immun. 2001 69:3762). Por lo tanto, mAb 4B11 puede reconocer un epítipo NspA que es específico para la cepa 8047, o un epítipo u otra proteína de membrana que no está presente en la cepa BZ198 pero está presente y asociada con la expresión NspA en la cepa 8047. Tomados juntos, los resultados con los diferentes mAbs muestran que la vacuna de antígeno anti-CHORI produce anticuerpos contra tanto proteínas altamente conservadas como no conservadas.

L. Actividad bactericida de mAbs de antígeno anti-CHORI con cepas MenB diversas

La actividad bactericida mediada por complemento de mAbs preparados de ratones inmunizados con antígeno anti-CHORI, y probados contra cepas MenV se resume en la Figura 20. El anticuerpo monoclonal 1D9, que reacciona por ELISA con todas las cepas de *N. meningitidis* probadas, no fue bactericida. El anticuerpo 14C7 monoclonal, que parece reconocer NspA, fue bactericida o bacterioestático contra todas las cepas probadas excepto BZ198ΔNspA (un derivado de NspA). La actividad del anticuerpo monoclonal 14C7 fue superior a aquella del anticuerpo monoclonal de control AL12 (producido en ratones inmunizados con NspA recombinante (ver Moe *et al.*, Infect. Immun. 2001 69:3762). Esta observación sugiere que la inmunización con la vacuna CHORI proporciona un medio superior para producir anticuerpos anti-NspA en comparación con la inmunización con una vacuna en base a NspA recombinante.

El anticuerpo monoclonal 4B11 (un anticuerpo IgM) fue bactericida contra cepas 1000 y CU385. Observe que el anticuerpo monoclonal 4B11 no

reacciona con estas mismas cepas por ELISA de célula completa a la concentración más elevada probada (ver Figura 19). El análisis bactericida mide la actividad del anticuerpo funcional utilizando bacterias vivas mientras que la ELISA de célula bacterial mide el anticuerpo que se une a bacterias muertas por calor, que en estas cepas pueden tener desnaturalizado el objetivo antigénico de mAb 4B11.

DEPÓSITOS

Un depósito de cultivos biológicamente puros de los materiales en la tabla de abajo se hace con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209, bajo las provisiones del Tratado de Budapest, en o antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. El número de acceso indicado se asigna después de la prueba de viabilidad exitosa, y los honorarios de requisito se pagan. El acceso a dichos cultivos será disponible durante la suspensión de la solicitud de patente a una determina por el Comisionado a nombrarse bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. Toda la restricción en la disponibilidad de dichos cultivos al público se removerá irrevocablemente en la garantía de una patente en base a la solicitud. Además, los depósitos designados se mantendrán por un periodo de treinta (30) años desde la fecha de depósito, o por cinco (5) años después de la última solicitud de depósito; o por la vida exigible de la Patente de E.U. cualquiera que sea su duración. Si un cultivo se vuelve no viable o se destruye de manera inadvertida, o, en el caso de cepas que contienen plásmido, se pierde su plásmido, se reemplazará con un cultivo viable de la misma descripción taxonómica.

Estos depósitos se proporcionan meramente como una conveniencia para aquellos de experiencia en la materia, y no son una admisión que requiere un depósito. Puede requerirse licencia para hacer, utilizar o

vender los materiales depositados, y tal licencia no se garantiza en la presente.
El depósito de abajo se recibe por ATCC en o antes de la fecha de presentación de la presente solicitud.

Descripción	No. de Acceso ATCC
Hibridoma 1D9	XX1
Hibridoma 4B11	XX2
Hibridoma 9B8	XX3
Hibridoma 14C7	XX4
Cepa MenC RM1090	XX5
Cepa MenB BZ198	XX6
Cepa MenA Z1092	XX7

REIVINDICACIONES

1.

Un método para producir inmunidad protectora de espectro amplio contra *Neisseria meningitidis*, dicho método comprendiendo las etapas de:

5 administrar a un mamífero una primer preparación de microvesículas (MVs) de una primer especie de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un primer serotipo y de un primer serosubtipo, en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítomos presentes en dicha primer preparación; y

10 administrar a dicho mamífero una segunda preparación de MVs de una segunda especie de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un segundo serotipo y de un segundo serosubtipo, en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítomos presentes en dicha segunda preparación;

15 en donde el serotipo o serosubtipo de cada una de la primer, segunda y tercer especie de *Neisseria meningitidis* es diferente, y en donde la administración de la primer, segunda y tercer preparación es suficiente para producir una respuesta inmune en dicho mamífero, en donde dicha respuesta inmune confiere inmunidad protectora contra una enfermedad causada por más
20 de una cepa de especies de *Neisseria meningitidis*.

2. El método según la reivindicación 1, el método comprendiendo además:

25 administrar a dicho mamífero una tercer preparación de vesículas de membrana exterior (OMV), MVs, o ambas, OMVs y MVs, de una tercer especie de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un tercer serotipo y un tercer serosubtipo, en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítomos presentes en dicha tercer preparación.

3. El método según la reivindicación 2, caracterizado porque la primer, segunda y tercer preparación se administran serialmente.

4. El método según la reivindicación 3, caracterizado porque las preparaciones se administran de manera que la primer preparación se
5 administra primero, la segunda preparación se administra después, y la tercer administración se administra al último.

5. El método según la reivindicación 1, caracterizado porque la primer, segunda y tercer preparación se administran como una mezcla.

6. El método según la reivindicación 1, caracterizado porque la
10 tercer preparación comprende MVs.

7. El método según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmunidad protectora conferida es contra una enfermedad en al menos cuatro cepas de especie de *Neisseria meningitidis*.

8. El método según la reivindicación 7, caracterizado porque la
15 inmunidad protectora conferida es contra una enfermedad causada por más de una cepa de especie de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B.

9. Un método para producir inmunidad protectora de espectro amplio contra una enfermedad causada por un miembro de serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, dicho método comprendiendo las etapas de:

20 administrar a un mamífero una primer preparación de microvesículas (MVs) de una primer especie de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un primer serosubtipo, en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítomos presentes en dicha primer preparación;

administrar a dicho mamífero una segunda preparación de MVs de
25 una segunda especie de *Neisseria meningitidis* que es un miembro de un segundo serosubtipo, en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítomos presentes en dicha segunda preparación;

en donde el serosubtipo de cada una de la primer y segunda especie de *Neisseria meningitidis* es diferente, y en donde la administración de la primer y segunda preparación es suficiente para producir una respuesta inmune en dicho mamífero, en donde dicha respuesta inmune confiere
5 inmunidad protectora contra una enfermedad causada por al menos cuatro cepas de especies de *Neisseria meningitidis*.

10. El método según la reivindicación 9, caracterizado porque el método comprende además administrar a dicho mamífero una tercer preparación de una tercer especie de *Neisseria meningitidis* que es un miembro
10 de un tercer serosubtipo, la tercer preparación comprendiendo vesículas de membrana exterior (OMV), MVs, o ambas, OMVs y MVS, dicha administración siendo una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítomos presentes en dicha tercer preparación, en donde el serosubtipo de la primer y tercer especie es diferente.

15 11. El método según la reivindicación 10, caracterizado porque el serosubtipo de la primer, segunda y tercer especie es diferente.

12. El método según la reivindicación 9, caracterizado porque la primer y segunda preparación se administran como una mezcla.

20 13. El método según la reivindicación 9, caracterizado porque la primer y segunda preparación se administran serialmente.

14. Un método para producir inmunidad protectora de espectro amplio contra una enfermedad causada por una especie de *Neisseria meningitidis*, dicho método comprendiendo las etapas de:

25 administrar a un mamífero una primer preparación de una primer especie de *Neisseria meningitidis*, la primer preparación comprendiendo las vesículas de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV, dicha administración de la primer preparación siendo en una cantidad

suficiente para producir una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha primer preparación;

administrar a un mamífero una segunda preparación de una segunda especie de *Neisseria meningitidis* que es genéticamente diversa a la
5 primer especie de *Neisseria meningitidis*, la segunda preparación comprendiendo las vesículas de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV, dicha administración de la segunda preparación siendo en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha segunda preparación;

10 en donde la administración de la primer y segunda preparación produce una respuesta inmune en dicho mamífero, en donde dicha respuesta inmune confiere inmunidad protectora contra una enfermedad causada por más de una cepa de especie de *Neisseria meningitidis*.

15 15. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende la etapa adicional de administrar a dicho mamífero una tercer preparación de vesículas de membrana exterior de una tercer especie de *Neisseria meningitidis*, tal tercer especie que es genéticamente diversa a al menos la primer especie de *Neisseria meningitidis*, dicha administración siendo en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítopos
20 presentes en dicha tercer preparación.

16. Un método para producir inmunidad protectora de espectro amplio contra una enfermedad causada por una especie de *Neisseria meningitidis*, dicho método comprendiendo las etapas de:

administrar a un mamífero una primer preparación de antígeno de
25 una primer especie de *Neisseria meningitidis*, dicha administración de la primer preparación siendo en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha primer preparación;

administrar al mamífero una segunda preparación de antígeno de una segunda especie de *Neisseria meningitidis* que es genéticamente diversa a la primer especie de *Neisseria meningitidis*, dicha administración de la segunda preparación siendo en una cantidad suficiente para producir una respuesta
5 inmune a epítopos presentes en dicha segunda preparación;

en donde la administración de la primer y segunda preparación produce una respuesta inmune en dicho mamífero, en donde dicha respuesta inmune confiere inmunidad protectora contra una enfermedad causada por más de una cepa de especie de *Neisseria meningitidis*.

10 17. El método según la reivindicación 16, caracterizado porque el método comprende además administrar al mamífero una tercer preparación de antígeno de una tercer especie de *Neisseria meningitidis* que es genéticamente diversa a al menos la primer especie de *Neisseria meningitidis*, dicha administración de la tercer preparación siendo en una cantidad suficiente para
15 producir una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha segunda preparación.

18. El método según la reivindicación 16, caracterizado porque la primer y segunda preparación de antígeno se administran serialmente.

19. El método según la reivindicación 16, caracterizado porque la
20 primer y segunda preparación de antígeno se administran como una mezcla.

20. El método según las reivindicaciones 1, 9, 14 ó 16, caracterizado porque las preparaciones de OMV y MV se administran junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

21. El método según las reivindicaciones 1, 9, 14 ó 16,
25 caracterizado porque los excipientes comprenden un adyuvante.

22. El método según las reivindicaciones 1, 9, 14 ó 16, caracterizado porque el adyuvante se selecciona del grupo que consiste de

fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alum o MF59.

23. El método según las reivindicaciones 1, 9, 14 ó 16, caracterizado porque la administración es por inyección.

24. El método según las reivindicaciones 1, 9, 14 ó 16, caracterizado porque la administración es por administración oral o por aerosol.

25. El método según las reivindicaciones 1, 9, 14 ó 16, caracterizado porque el mamífero es un humano.

26. El método según la reivindicación 25, caracterizado porque el humano es inmunológicamente inocente con respecto a *Neisseria meningitidis*.

27. El método según la reivindicación 25, caracterizado porque el humano es un niño humano de menos de cinco años de edad.

28. Un método para identificar un epítipo antigénico que produce inmunidad protectora de espectro amplio contra una enfermedad causada por especie de *Neisseria meningitidis*, dicho método comprendiendo las etapas de:

15 *Diary* administrar a un mamífero una primer preparación de vesículas de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV de una primer especie de *Neisseria meningitidis*. Dicha administración siendo en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha primer preparación;

20 administrar a dicho mamífero al menos una segunda preparación de vesículas de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV de una segunda especie de *Neisseria meningitidis*, en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune a epítopos presentes en dicha segunda preparación, en donde la segunda *Neisseria meningitidis* spp es
25 genéticamente diversa a la primer *Neisseria meningitidis* spp, y en donde dicha administración de la primer y segunda preparación es suficiente para producir una respuesta inmune a al menos un epítipo presente en dicha primer y

segunda preparación, y en donde dicha respuesta confiere inmunidad protectora contra una enfermedad causada por especie de *Neisseria meningitidis*; e

identificar al menos un epítipo que produce inmunidad protectora de espectro amplio contra una enfermedad causada por especie de *Neisseria meningitidis*.

~~29.~~ Una composición que comprende:

una primer preparación seleccionada del grupo que consiste de vesícula de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV de una primera de una primer especie de *Neisseria meningitidis*; y

una segunda preparación seleccionada del grupo que consiste de vesícula de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV de una segunda especie de *Neisseria meningitidis*, en donde la segunda *Neisseria meningitidis* spp es genéticamente diversa a la primer especie de *Neisseria meningitidis*; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable.

~~30.~~ La composición según la reivindicación 29, que comprende además:

una tercer preparación seleccionada del grupo que consiste de vesícula de membrana exterior (OMV), microvesículas (MV), o ambas, OMV y MV de una tercer especie de *Neisseria meningitidis*, en donde la tercer especie de *Neisseria meningitidis* es genéticamente diversa a la primer especie de *Neisseria meningitidis*.

~~31.~~ La composición según la reivindicación 30, caracterizada porque:

la primer preparación comprende MV;

la segunda preparación comprende MV; y

la tercer preparación comprende OMV.

ca. 100000
de la misma
de la misma
de la misma

32. La composición según la reivindicación 29, caracterizada porque la primer y segunda especie de *Neisseria meningitidis* son genéticamente diversas en que difieren en al menos uno de serotipo o serosubtipo. *cuales*

5 33. La composición según la reivindicación 31, caracterizada porque la primer y tercer especie de *Neisseria meningitidis* son genéticamente diversas en que difieren en al menos uno de serotipo o serosubtipo. *cuales*

34. Una composición que comprende:

10 al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, el antígeno aislado estando presente en la composición en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune en un huésped mamífero, y caracterizándose como una proteína inmunoprecipitada con anti-sueros producidos después de la vacunación de un mamífero con la composición de la reivindicación 31, y teniendo una masa molecular aparente seleccionada del grupo que consiste de
15 aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 59.5 kDa, aproximadamente 40.7 kDa, aproximadamente 39.6 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 27.9 kDa y 14.5 kDa; y

un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35. Una composición que comprende:

20 al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, el antígeno aislado estando presente en la composición en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune en un huésped mamífero, y caracterizada como una proteína detectada por Western blot con anti-sueros producidos después de la vacunación de un mamífero con la composición de la reivindicación 31, y que
25 tiene una masa molecular aparente seleccionada del grupo que consiste de aproximadamente 53 kDa a 57 kDa; aproximadamente 46-47 kDa, aproximadamente 33 kDa, aproximadamente 20 kDa a 21 kDa, y

Ja.
Comp
Comp

aproximadamente 18 kDa; y

un excipiente farmacéuticamente aceptable.

36. Una composición que comprende:

al menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* aislado, el antígeno
5 aislado estando presente en la composición en una cantidad eficaz para
producir una respuesta inmune en un huésped mamífero, en donde el antígeno
es de una proteína que se une específicamente a un anticuerpo monoclonal
seleccionado del grupo que consiste de ID9 (No. de Acceso ATCC xx), 4B11
(No. de Acceso ATCC xx), 9B8 (No. de Acceso ATCC xx) y 14C7 (No. de
10 Acceso ATCC xx); y

un excipiente farmacéuticamente aceptable.

37. La composición según la reivindicación 34, 35 ó 36,
caracterizada porque la composición comprende al menos dos antígenos de
Neisseria meningitidis aislados.

15 38. Una composición que comprende antígenos de *Neisseria meningitidis* aislados, caracterizada porque dichos antígenos se identifican por el método de la reivindicación 28.

20 39. Un método para producir inmunidad protectora de espectro amplio contra una enfermedad causada por una especie de *Neisseria meningitidis*, dicho método comprendiendo administrar a un mamífero la composición de la reivindicación 34, 35, 36 ó 38.

de art. 10

- 96 -

RESUMEN

La presente invención proporciona generalmente métodos y vacunas para la prevención de enfermedades causadas por la bacteria *Neisseria meningitidis*, particularmente cepas del serogrupo B.

FIG 1 Resumen de pruebas de eficacia de la vacuna de vesícula de membrana exterior meningococal*

Años de estudio	Cepa de vacuna	Ubicación (población vacunada)	Edad (años)	Eficacia estimada (%)
1987-89	B 4 P1 15 C PS/alum	Cuba (100 000 niños de escuela)	11 a 16	83
1989-90	B 4 P1 15 C PSb/alum	Sao Paulo Brasil (300 000 niños)	2 a 4 4 1 a 7	47 74
1990-91	B 4 P1 15 C PS/alum	Rio de Janeiro Brasil (2 4 millones de niños)	3/12 a 7 4 a 7	58 71
1988-90	B 4 P1 3 C PS/alum	Iquique Chile (40 000 niños)	1 a 3 9 4 a 21	-23 70
1989-91	B 15 P1 7 16 alum	Noruega (171 800 niños de escuela)	14 a 16	57

* Adaptada de Frasch (1995 en MENINGOCOCCAL DISEASE K Cartwright (ed) Wiley Nueva York NY p 266) En Noruega dos dosis de vacuna se dan por separado por 6 semanas La eficacia fue de 87% en el primer año y después se declina durante los 18 meses subsiguientes de manera que la eficacia total fue del 57% C PS = vacuna de polisacárido de Serogrupo C que se mezcla con las vesículas Las preparaciones de alum fueron Al(OH)₃

**FIG. 2**

FIG. 3

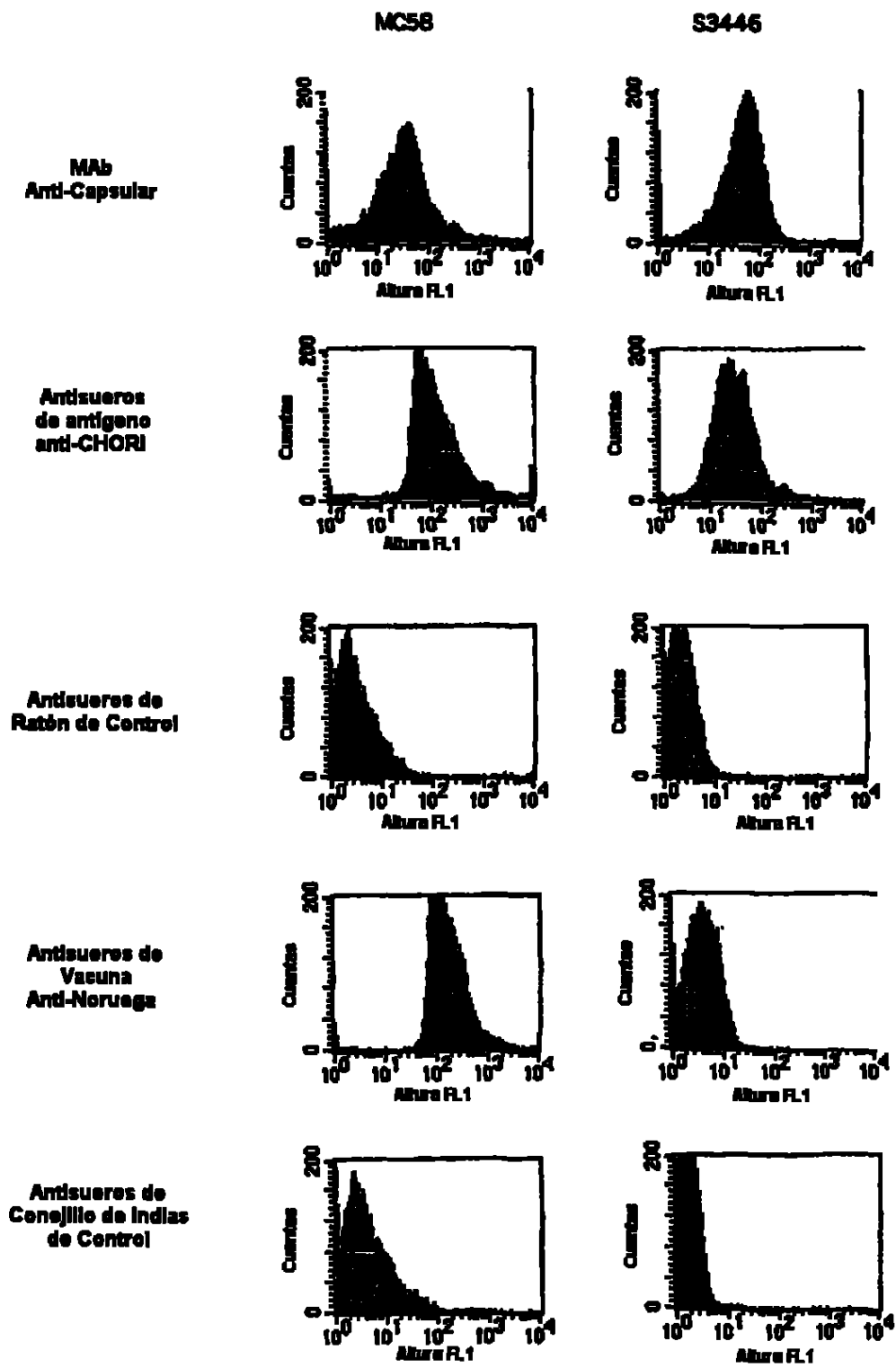


FIG 4 Unión de la superficie celular bacteriana de antisueros determinados p r cit metría de flujo de fluorescencia directa

Cepa (aerosubtipo)	PorA heterólogo a cepas de vacuna CHORI+++	Reactividad de superficie por citometría de flujo de fluorescencia indirecta (1/concentración)+		
		Anti CHORI++	Anti Noruega++	Anti-NspA++
1000(5)	-	>200	>200	20
2998(5 2)	-	2000	<20	20
8047 (5 2)	-	>200	<20	>20
BZ198(4)	-	2000	200	>20
CU385(18 16)	+	>200	<20	>20
IH5341(7 16)	+	>200	>200	<20
M136(P-)	—+	<20	<20	<20
M988(5 2)	-	2000	<20	<20
MC58(7 16)	+	200	>200	<20
NG3/88(1)	+	200	200	<20
NMB(5 2)		2000	ND	>20
S3446(23 14)	+	200	<20	<20

+ La concentración se define como la dilución requerida para dar 50% de fluorescencia (Altura FL1) de 10 o más durante la fluorescencia anterior de células en la presencia de sueros de control

++ Antisueros anti CHORI preparados en ratones por inmunización secuencial con MV de cepa RM1090 (C 2a P1 5 2) entonces MV de cepa BZ198 (B NT P1 4) seguida por OMV de cepa Z1092 (A 4 21 P1 10) (ver texto) Anti-noruega se refiere al antisuero de conejillos de Indias a los que se les dan dos inyecciones de vacuna OMV preparadas de cepa H44/76 (B 15 P1 7 16) por el National Institute of Public Health (MenB-Folkehelsa) Oslo Noruega Anti-NspA se refiere a antisueros preparados en ratones CD1 a los que se les dan tres inyección de NspA recombinante como se describe por Mos *et al* (1999 Infect Immun 87 5664)

+++Serosubtipo (PorA) difiere de aquellos de las tres cepas utilizadas para preparar la vacuna (ver Figura 21 y 22)

28

FIG 5 Reactividad de antisueros CHORI contra cepas de serogrup A y C de N meningitidis

Cepa (serogrupo serosubtipo)		Actividad bactericida (1/concentración)*		Unión de superficie por citometría de flujo de fluorescencia indirecta (1/concentración)+	
		Sueros de control negativo	Anti-CHORI	Sueros de control negativo	Anti CHORI
60E (C P1 7 1)		<10	>250	<20	~2000
Z1073 (A P1 3 6)		<10	>250	ND	>>100

* Dilución de suero que produce 50% de reducción en unidades formadoras de colonia (CFU) por ml después de 60 minutos de incubación de bacterias en la presencia de complemento humano en comparación con CFU/ml en tiempo cero de controles (ver Figura 6 abajo)

+ Ver pies de página para la Figura 4 y texto

FIG 6 Resultados de un análisis bactericida que prueba el antígeno anti-CHORI, anti-rNspA, y antisueros de vacuna anti-Noruega contra cepa meningococal B 2998

Complemento	Fuente animal de sueros o mAb	Anticuerpo/antisuero +	Concentración final/dilución	CFU/20 µl 0	CFU/20 µl 60	% de Supervivencia
Ninguno	-	Ninguno	0	189	250	132
Ninguno	-	Ninguno	0	171	250	148
Activo	-	Ninguno	0	175	250	143
Inactivo	-	Ninguno	0	180	250	139
Activo	-	Complemento	1 5	190	250	132
Activo	Ratón	mAb anti-capsular	200µg/ml		1	1
Activo	Ratón	mAb anti-capsular	100µg/ml		43	24
Activo	Ratón	mAb anti-capsular	50µg/ml		225	124
Inactivo	Ratón	mAb anti-capsular	200µg/ml		230	127
Activo	Ratón	Anti-rNspA	1 10		250	138
Activo	Ratón	Anti-rNspA	1 50		250	138
Activo	Ratón	Anti-rNspA	1 250		250	138
Activo	Ratón	Antígeno anti-CHORI	1 10		0	0
Activo	Ratón	Antígeno anti-CHORI	1 50		2	1
Activo	Ratón	Antígeno anti-CHORI	1 250		55	30
Activo	Ratón	Control anti-E coli	1 10		>250	138
Activo	Conejillo de Indias	Vacuna anti-noruega	1 5		220	122
Activo	Conejillo de Indias	Vacuna anti-noruega	1 25		245	135
Activo	Conejillo de Indias	Vacuna anti-noruega	1 125		250	138
Activo	Conejillo de Indias	Control anti-alum	1 5		250	138

+ Ver pies de página para la Figura 4 y texto

FIG 7 Actividad bactericida mediada por complemento d antisueros y anticuerp s

Cepa (serosubtipo)	PorA heterólogo a cepas de vacuna CHORI	Actividad bactericida (1/concentración)+		
		Anti-CHORI	Anti-Noruega	Anti-NapA
1000(5)	-	130	>125	<10
2996(5 2)	-	>250	<5	<10
8047 (5 2)	-	>250	<5	<10
BZ198(4)	-	>250	I**	110
CU385(16 15)	+	>250	<25	<10
IH5341(7,16)	+	>250	I**	<10
M136(P-)	+	<10	<5	<10
M886(5 2)	-	>250	<5	<10
MC58(7 16)	+	>250	>125	<10
NG3/88(1)	+	13	9	<10
NMB(5 2)		>100	<5	16
S3446(23 14)	+	10	<5	<10

+Ver pies de página para las Figuras 4 y 5 y texto Concentración > se refiere a la dilución más elevada probada
concentración < se refiere a la dilución más baja probada

++I no se determina debido a la presencia de actividad bactericida en los antisueros de control negativo contra esta cepa

FIG 8 Actividad bactericida mediada por complemento de antisueros de ratones inmunizados con las vacunas indicadas

Cepa (serosubtipo)	PorA heterólogo a cepas de vacuna CHORI+++	Actividad bactericida (1/concentración)+++			
		CHORI CFA+ (N=7)	CHORI/Al ₂ (OPO ₄) ₃ ⁺ (N=7)	CHORI MIX/Al ₂ (OPO ₄) ₃ ⁺ (N=10)	E COLI MV/ Al ₂ (OPO ₄) ₃ (N=10)
1000(5)	-	20	128	8	<4
8047 (5 2)	-	125	300	125	<25
BZ198(4)	-	650	220	100	<4
BZ198 NapA(4)	-	317	131	235	<4
BZ83(10)	-	275	109	205	<25
CU385(19 15)++	+	>128	128	<4	<5
H44/76 (7 16)	+	>128	>128	21	6
M138(P-)	+	100	<4	5	<4
M688(5 2)	-	193	101	133	<4
MC58(7 16)++	+	47	8	7	<4
NG3/88(7 1)	+	<4	4	<4	<4
NGP165 (5 2)	-	82	120	90	<4
NMB(5 2)	-	183	441	141	<4
S3032(12 16)	+	125	400	230	<25
S3446(25 14)	+	18	<4	<4	<4

+CHORI/CFA Inmunización secuencial con una dosis de 5µg de cepa RM1090 (C 2a P1 5,2) MV con CFA cepa BZ198 (B NT P1 4)MV con IFA y cepa Z1090 OMV (A 4 21 P1 10) sin adyuvante CHORI/Al₂(OPO₄)₃ igual que CHORI/CFA excepto utilizando fosfato de aluminio como un adyuvante CHORI MIX/Al₂(OPO₄)₃ igual que CHORI/Al₂(OPO₄)₃ excepto que cada dosis de 5 µg contuvo una mezcla igual de las tres preparaciones MV/OMV E COLI MV/Al₂(OPO₄)₃ MV preparada de la cepa E coli BL21 (DE3)

++ w/glu cultivo celular crecido en la presencia de 0 3% de glucosa +++ Ver pies de página y texto de la Figura 4

FIG 9 Actividad bactericida de antisueros de conejillos de Indias inmunizados con las vacunas Indicadas+

Cepa (serosubtipo)++	PorA heterólogo a cepas de vacuna CHORI+++	Actividad bactericida (1/concentración)+++		
		CHORI/Al ₂ (OPO ₄) ₃ (N=8)	CHORI/Al ₂ (OH) ₃ (N=3)	E COLI MV/ Al ₂ (OPO ₄) ₃ (N=8)
M138(P-)	+	<4	<4	<4
S3446(22 14)	+	6	4	<4
CU385(19 15)	+	12	5	<4
1000(5)	-	64	16	<4
H44/76(7 16)	+	64	16	<4
BZ83(10)	-	24	12	<4
8047(5 2)	-	<128	100	<4
BZ188(4)	-	28	6	<4
BZ188ΔNapA(4)	-	19	5	<4
NG3/88(7 1)++	+	9	5	<4

+CHORI/Al₂(OPO₄)₃ Inmunización secuencial con una dosis de 5 microgramos de cepa RM1090 (C 2a,P1 5 2) MV cepa BZ198 (B NT P1 4)MV y cepa Z1090 OMV (A 4 21 P1 10) fosfato de aluminio como adyuvante, CHORI/Al₂(OH)₃ igual que CHORI/Al₂(OPO₄)₃ excepto utilizando hidróxido de aluminio como un adyuvante E COLI MV/Al₂(OPO₄)₃ MV preparada de la cepa E coli BL21 (DE3)

++ Todas las cepas se desarrollaron en la presencia de 0.3% de glucosa

+++ Ver pies de página y texto de la Figura 4

195

FIG 10 Protección pasiva en ratas Infantes contra bacteremia de cepa mening c cal B 8047 por antisueros y anticuerpos +

Tratamiento++	Dosis/rata o dilución de suero (100 microlitros)	Cultivo celular obtenido a las 18 hrs	
		No positivo/no total	Geo Promedio, 10 ⁴ CFU/ml
mAb anti capsular	10 microgramos	0/5	<1
Control PBS	-	5/5	>200
Control anti-E coli	1 20	5/5	>200
Anti-CHORI	1 20	0/5	<1
Anti-Noruega	1 20	5/5	83
Control alum	1 20	5/5	178

+Animales se pretrataron en el tiempo 0 con anticuerpos de prueba o control y probaron 2 horas después con 5 x 10⁵ unidades que formen la colonia de cepa N meningitidis fase log dada IP

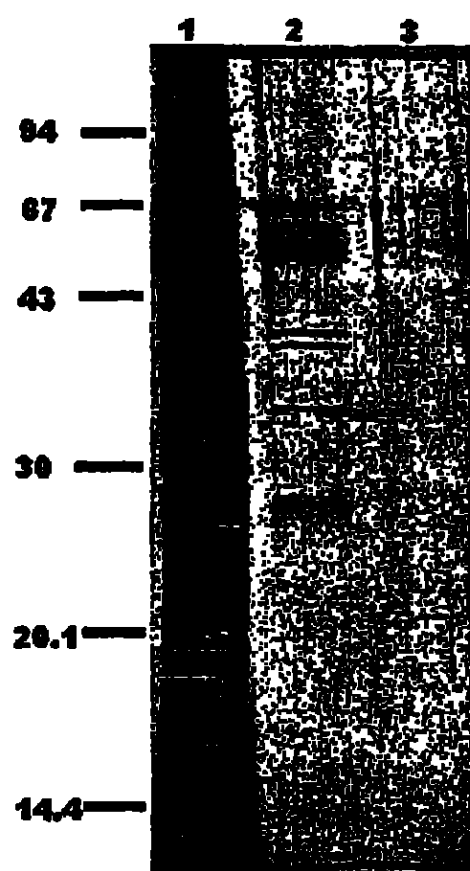
++ Ver ples de página para la Figura 4 y texto

FIG 11 Protección pasiva en ratas infantiles contra bacteremia de cepa meningococal B 8047 p r
antisueros de conejillos de Indias

Tratamiento*	Dosis/rata o dilución de suero (100 microlitros)	Cultivo celular obtenido a las 18 hrs	
		No positivo/no total	Geo Promedio, 10 ⁴ CFU/ml
Pre-inmunización	1 10	6/6	21 8
Anti-CHORI/Al ₂ (OPO ₄) ₃	1 10	0/6	<0 001
Anti-CHORI/Al ₂ (OPO ₄) ₃	1 100	4/6	1 3
Anti-CHORI/Al ₂ (OPO ₄) ₃	1 1000	6/6	193
Anti-CHORI/Al(OH) ₃	1 10	0/6	<0 001
Anti-CHORI/Al(OH) ₃	1 100	6/6	47 4
Anti-CHORI/Al(OH) ₃	1 1000	6/6	32 0
Anti-E coll MV	1 10	6/6	110
mAb anti-capsular de ratón (SEAM 3)	20 µg	3/3	1 4

*Ver pies de páginas para las Figuras 9 y 10 y texto

197

**FIG. 12**

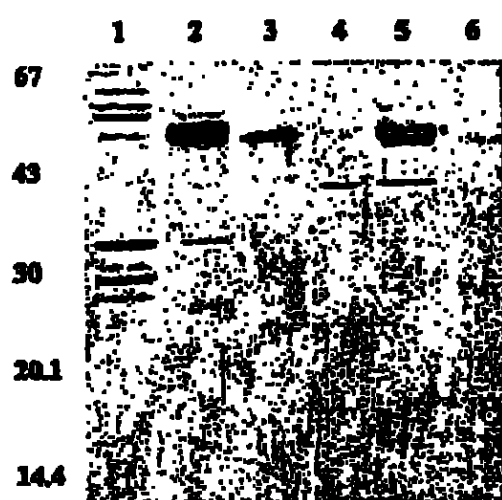


FIG. 13

FIG 14 Proteínas accesibles a la superficie bacteriana precipitadas por antisueros agrupados de ratones secuencialmente inmunizados con cepa MenC RM1090 MV, cepa MenB BZ198 MV, y cepa MenA Z1092 OMV

Cepa/Muestra	Serotipo subtipo+	Proteínas precipitadas (por masa aparente en kDa)		
RM1090MV	2a P1 5,2 L3 7	37-41	31-33	<30
BZ1098 MV	NT NST	40 7 39 6	32	
Z1092 OMV	4 21 P1 10	37 1 35 1	32 30	
BZ198	NT NST	40 7 39 1 38 6 37 6	33 1 32 5 31 5	
CU385	4 7 P1 19 15		32 5	14 5
MC58	15 P1 7 18		32 4	
NG3/88	8 P1 1		32 9	25 7
NMB	2b P1 5 2	40 7 39 6	33	14 5
S3448	19 14 P1 23 14		32 9	25 7

+Ver texto y ples de páginas de las Tablas 21 y 22 (abajo)

FIG 14A Proteínas accesibles de superficie bacteriana precipitadas por antisuer s agrupados de ratones secuencialmente inmunizados con cepa MenC RM1090 MV, cepa MenB BZ198 MV y cepa MenA Z1092 OMV

Cepa	Serotipo subtipo	Proteínas precipitadas (por masa aparente en kDa)							
		>45		36-45		25-35		<25	
		Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2
BZ198	NT NST	80		38 39 43	37 40	28 30	28	14 5	12
CU385	4 7 P1 19 15	80		38 42	42	30 34		10	11
1000	NT P1 5		ND	41,45	ND	26	ND		ND

+ Ver texto y ples de página de las Figuras 21 y 22 (abajo) Expts 1 y 2 se refieren a los experimentos realizados con grupos de suero Inmunes de diferentes grupos de ratones Inmunizados con diferentes preparaciones de vacuna CCHORI ND = sin hacer (cepa 1000 probada con suero Inmune de un grupo de ratones inmunizados)

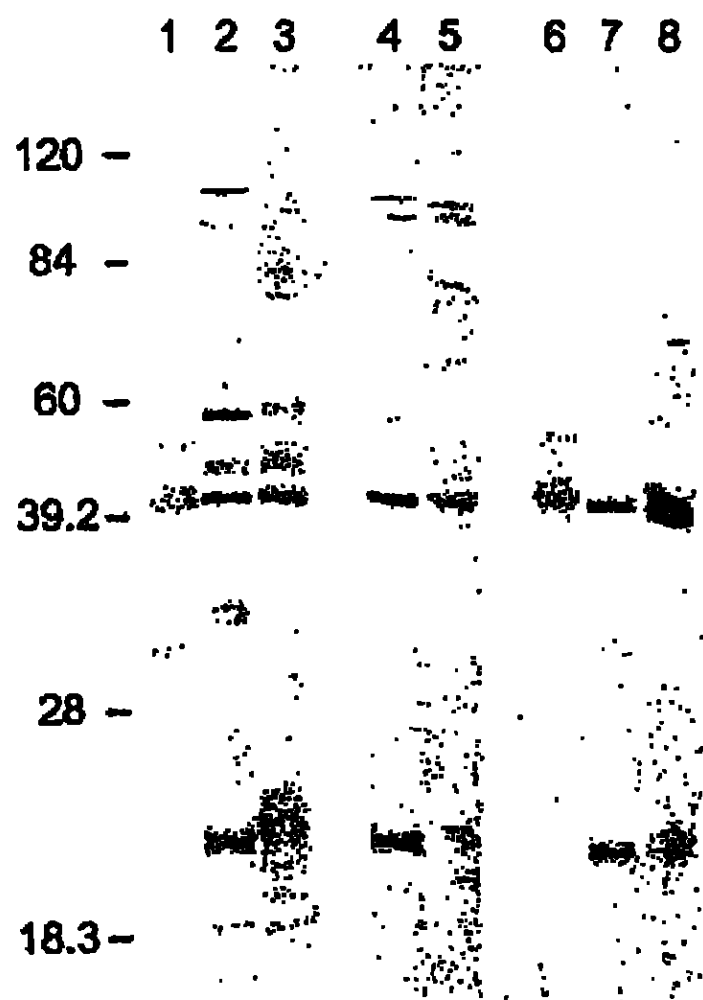


FIG. 15

FIG 16 Proteínas reactivas con antisueros de antígeno anti-CHORI por Western blot de preparaciones de MV y OMV

Antisueros anti-CHORI/CFA de ratón*			Anti-CHORI/Al ₂ (OPO ₃) ₂ ** de ratón		Antisueros anti-CHORI/ Al ₂ (OPO ₃) ₂ ** de Conejillo de Indias		
RM1090MV	BZ198MV	Z1092 OMV	BZ198 MV	Z1092 OMV	RM1090 MV	BZ198 MV	Z1092 OMV
	119			118			
108				107			
101		101	101	99			
	98	97	95	94			
	93	93	91	92			92
		88					
		81		78			
		76					76
67	67	69		67	66		68
				64	62		64
53*	66*	57*	56	51	53	55	59
	50	50					
46*	47*	47*	47	46	47	46	46
	36	38				34	
33*	33*	35*	33	33	32	33	33
	27				24		
	20*	21*	20	21		20	
		19		19	19		19
	18*	16*	18	18			

+Ver ples de página y texto de la Figura 8
++Ver ples de página y texto de la Figura 9
* Indica proteínas más reactivas con antisueros CHORI/CFA y comunes a al menos dos de las tres preparaciones de vacuna

FIG 17 Reactividad de antisueros anti-CHORI con LOS por ELISA

Antisueros+	RM1090 LOS(1/concentración)++		BZ198 LOS (1/concentración)++		Z1092 LOS (1/concentración)++	
	Sin absorber	Absorbido++	Sin absorber	Absorbido++++	Sin absorber	Absorbido++++
Anti-CHORI de ratón	<100	<100	900	<100	150	<100
Anti-CHORI mix de ratón	900	100	200	<100	800	100
Anti-CHORI de conejillo de Indias	<100	<100	350	100	<100	<100
Anti-CHORI mix+++ de conejillos de Indias	<100	<100	300	100	<100	<100

+Ver pies de páginas y texto de la Figura 8 y 9

++La concentración se define como la dilución de suero dando un OD 405 nm de 0.5 después de 1 hr de incubación con sustrato

+++Igual como se utiliza para preparar antisueros mix anti-CHORI (ver Figura 8) excepto que la dosis total de 25 microgramos de proteína se da preferentemente que 5 microgramos

++++Después de la incubación con LOS-BSA acoplada a Sepharose (ver texto)

FIG 18 Actividad bactericida de antisueros anti-CHORI antes y después de la absorción de anticuerpos anti-LOS

Suero**	Cepa BZ198 (1/concentración)*		Cepa S3032 (1/concentración)*	
	Sin absorber	Absorbido++	Sin absorber	Absorbido++
Anti-CHORI de ratón	49	28	259	247
Anti-CHORI mix de ratón	350	111	234	102
Anti-CHORI de conejillo de Indias	125	93	13	5
Mix de conejillo de Indias	77	31	>5	14

+Ver pies de páginas y texto para la Figura 5

++Después de la incubación con LOS-BSA acoplado a Sepharose (ver texto)

+++Ver pies de páginas y texto para Figura 17

FIG 19 Reactividad de mAbs producida p r inmunización con vacuna CHORI con cepas bacterianas, LOS, y rNspA por ELISA

Cepa+	[mAb] (mg/ml) dando OD 405 nm = 0.5 después de 1 hr de incubación con sustrato				
	1D9 (IgG2a)	4B11 (IgM)	9B8 (IgG3)	14C7 (IgG3)	Anti-NspA mAb AL4+++ (IgG2a)
Nm 1000	500	>720**	>3970	7380*	1000
Nm 4335	500	>720	13	30	30
Nm 8047	200	2.4	>3970	10	20
Nm 8047ΔNspA	800	>720	>3970	>7380	>5400
Nm BZ198	800	>720	16	2	20
Nm BZ198 ΔNspA	800	>720	16	>7380	>5400
Nm BZ83	800	>720	>3970	273	80
Nm CU385	800	>720++	>3970	>7380++	180
Nm M138	800	>720	>3970	38	400
Nm M3988	1000	>720	>3970	0.5	50
Nm M988	800	>720	>3970	5	400
Nm NG3/88	800	0.8	>3970	1	70
Nm NGE31	500	>720	>3970	0.4	100
Nm NGF28	800	2.4	>3970	0.2	40
Nm S3446	500	>720	>3970	>7380	40
Hln Minn A	>8300	>720	>3970	>7380	ND
HI Eegen	>8300	>720	>3970	>7380	ND
Nm RM1090 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	ND
Nm BZ198 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	ND
Nm Z1082 LOS	>8300	>720	>3970	>7380	ND
RNspA MV	>8300	>720	>3970	28	6

+Nm *Neisseria meningitidis*, HI *Haemophilus influenzae*

++Aunque negativo por ELISA 14C7 es bacteridia para estas cepas (ver Figura 20)

+++Ver Moe et al , Infect Immun 2001 69 3782)

FIG 20 Actividad bactericida de mAbs producida p r inmunización con vacuna CHORI

Cepa (serosubtipo)	PorA heterólogo a cepas de vacuna CHORI+	mAb probado por actividad bactericida **				
		ID9	4B11	9B8	14C7	AL12**
1000	-	-	+	-	+	+
BZ198	-	-	estático	+	+	+
BZ198ΔNapA	-	-	-	+	-	-
CU385	+	-	+		+	-
M986	-	-	-	-	+	-
NG3/88	+	-	estático	-	estático	-

+Ver texto y ples de páginas de la Figura 4

++ + se refiere a bactericida cuando se prueba al menos a o igual a 100 microgramos/ml, estático se refiere a un por ciento de supervivencia de CFU/ml a 60 min es mayor que 50% pero menor que 100% (ver Figura 6)

+++Moe et al Infect Immun 2001 69 3762

FIG 21 Serotipo meningococal y serosubtipo que define anticuerpos monoclonales disponibles de RIMV*

Reactivos de serotipificación			Reactivos de serosubtipificación		
Monoclonal	Tipo	Ig	Monoclonal	Tipo	Ig
MN3C8B	1	G2b	MN14C2 3	P1 1	G2a
MN2D3F	2A	G2a	MN16C13F4	P1 2	G2a
MN2C3B	2B	G2a	MN20B9 34	P1 4	G2a
MN14G21	4D	G2a	MN22A9 19	P1 15	G2a
MN5C8C	14	G2a	MN19D6 13	P1 6	G3
MN15A14H6	15	G2a	MN14C11 6	P1 7	G2a
			MN5A10F	P1 9	G2a
			MN5A10F	P1 9	G2a
			MN20F4 17	P1 10	G2b
			MN20A7 10	P1 12	G3
			MN24H10 75	P1 13	G2a
			MN21G3 17	P1 14	G3
			MN3C5C	P1 15	G3
			MN5C11G	P1 16	G2b

*Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu (RIMV) P O Box 457 3720 AL Bilthoven, Países Bajos (referencia FEMS Microbiology Letter 48 (1987) 367-371)

FIG 22 Anticuerp s mon clonales qu definen el serogrupo, serotipo y serosubtlp disponibles de NIBSC*

Serogrupo	No Cat	Serotipo	No Cat	Serosubtipo	No Cat
A	95/674	P2 2a	95/682	P1 1	95/694
B	95/750	P2 2b	95/684	P1 10	95/710
C	95/676	P3 1	95/680	P1 12	95/712
		P3 14	95/688	P1 13	95/714
		P3 15	95/690	P1 14	95/716
		P3 21	95/692	P1 15	95/718
		P3 4	95/686	P1 16	95/720
				P1 2	95/696
				P1 3	95/698
				P1 4	95/700
				P1 5	95/702
				P1 6	95/704
				P1 7	95/706
				P1 9	95/708

*National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), División de Bacteriología Blanche Lane, South Mimms Potrees Bbar Herts EN6 3QG Reino Unidos

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Granoff, Dan
Noe, Gregory R.
- <120> VACUNAS PARA PROTECCIÓN DE ESPECTRO AMPLIO
CONTRA ENFERMEDADES CAUSADAS POR NEISSERIA MENINGITIDIS
- <130> CBOR-001WO
- <140> Sin Asignar
<141> 2001-07-27
- <150> US 60/221,495
<151> 2000-07-27
- <160> 1
- <170> FastSEQ para Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Nucleótidos CpG
- <400> 1
tccatgacgt tccatgacgt

TRANSMITTAL LETTER TO THE
UNITED STATES RECEIVING
OFFICE

Date	23 January 2002
International Application No.	PCT/US01/23842
Attorney Docket No.	CHOR-001WO

I. Certification under 37 CFR 1.10 (if applicable)

EL824 072 794US	23 January 2002
Express Mail mailing number	Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231

II. ☐ New International Application

TITLE		Earliest priority date (Day/Month/Year)

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION: In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied. (Note: check as many boxes as apply):

- A. ☐ The invention disclosed was not made in the United States.
B. ☐ There is no prior U.S. application relating to this invention.
C. ☐ The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application. (NOTE: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority.)

application no.		filed on	
application no.		filed on	

- D. ☐ The present international application ☐ contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C above. The additional subject matter is found on pages _____ and ☐ DOES NOT ALTER ☐ MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15.

III. ☐ A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is(are) enclosed:

- A. ☐ A Request for An Extension of Time to File a Response
B. ☐ A Power of Attorney (General or Regular)
C. ☐ Replacement pages:

pages		of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figure
pages		of the description	pages		of the abstract
pages		of the claims			

- D. ☐ Submission of Priority Documents

Priority Document		Priority Document	
-------------------	--	-------------------	--

- E. ☐ Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex.

IV. ☐ A Request for Rectification under PCT Rule 91 ☐ A Petition ☐ A Sequence Listing Diskette

- V. ☒ Other (please specify): Transmittal, Demand (3 pages), Fee Sheet, Article 34 Amendment (4 pages), Request to Change Applicant Name under Rule 92bis, originally executed PCT General Power of Attorney, postcard

The person
signing this
form is the:

☐ Applicant	
☒ Attorney/Agent (Reg. No.) 36,513	Typed name of signer Carol L. Francis
☐ Common Representative	<i>Carol L. Francis</i> Signature

01/23/02
DOCKETED

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPRA/ US

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:

The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only		
Identification of IPRA		Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference CHOR-001WO
International application No. PCT/US01/23842	International filing date (day/month/year) 27 July 2001 (27/07/01)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 27 July 2000 (27/07/00)
Title of invention VACCINES FOR BROAD SPECTRUM PROTECTION AGAINST DISEASES CAUSED BY NEISSERIA MENINGITIDIS		
Box No. II APPLICANT(S)		
Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND 5700 Martin Luther King Jr. Way Oakland, California 94609 US		Telephone No. Facsimile No. Teleprinter No. Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US	
Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) GRANOFF, Dan 1085 Creston Road Berkeley, California 95708 US		
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US	
Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) MOE, Gregory R. 42 Steuben Bay Alameda, California 94502 US		
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US	
☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet		

Sheet No. 2International application No.
PCT/US01/23842

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The following person is ☒ agent ☐ common representative and ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination. ☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked. ☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.	
Name and address: <i>(Please print followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i> FRANCIS, Carol L. BOZICEVIC, FIELD & FRANCIS LLP 200 Middlefield Road, Suite 200 Menlo Park, California 94025 US	Telephone No. 650.327.3400 Facsimile No. 650.327.2321 Teleprinter No. Agent's registration No. with the Office 36,513
☐ Address for correspondence: <i>check this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.</i>	
Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION	
Statement concerning amendments: ^a 1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of: ☐ the international application as originally filed the description ☐ as originally filed ☒ as amended under Article 34 the claims ☐ as originally filed ☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement) ☒ as amended under Article 34 the drawings ☒ as originally filed ☐ as amended under Article 34 2. ☐ The applicant wishes any amendment to claims under Article 19 to be considered as reversed. 3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). <i>(This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)</i> * Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as amended.	
Language for the purposes of international preliminary examination: <u>ENGLISH</u> ☒ which is the language in which the international application was filed. ☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search. ☐ which is the language of publication of the international application. ☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.	
Box No. V ELECTION OF STATES	
The applicant hereby elects all eligible States <i>(that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)</i> excluding the following States which the applicant wishes not to elect:	

Sheet No. 3

International application No.
PCT/US01/23842

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

For International Preliminary Examining Authority use only

			received	not received
1.	translation of international application	sheets	☐	☐
2.	amendments under Article 34	4 sheets	☐	☐
3.	copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	sheets	☐	☐
4.	copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	sheets	☐	☐
5.	letter	sheets	☐	☐
6.	other (specify)	sheets	☐	☐

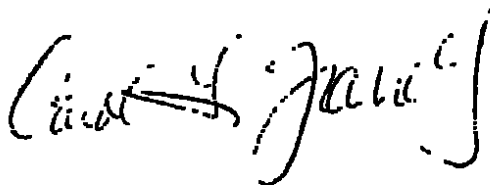
The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|---|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in computer readable form |
| 3. ☒ original general power of attorney | 7. ☒ other (specify): Transmittal, postcard |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | Request to Record Change of Applicant under Rule 92bis |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Carol L. Francis



For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.

☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.3.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

PCT

CHAPTER II

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Demand

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">International application No.</td> <td>PCT/US01/23842</td> </tr> <tr> <td>Applicant's or agent's file reference</td> <td>CHOR-001 WO</td> </tr> </table>	International application No.	PCT/US01/23842	Applicant's or agent's file reference	CHOR-001 WO	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">For International Preliminary Examining Authority use only</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="height: 40px; vertical-align: bottom;">Date stamp of the IPEA</td> </tr> </table>	For International Preliminary Examining Authority use only		Date stamp of the IPEA	
International application No.	PCT/US01/23842								
Applicant's or agent's file reference	CHOR-001 WO								
For International Preliminary Examining Authority use only									
Date stamp of the IPEA									
Applicant CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND									
CALCULATION OF PRESCRIBED FEES 1. Preliminary examination fee..... \$490.00 P 2. Handling fee (Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.) \$146.00 H 3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box..... \$636.00 TOTAL									
MODE OF PAYMENT ☒ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below) ☐ cash ☐ cheque ☐ revenue stamps ☐ postal money order ☐ coupons ☐ bank draft ☐ other (specify):									
AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT <i>(This mode of payment may not be available at all IPEAs)</i>									
☒ Authorization to charge the total fees indicated above. <i>(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the IPEA so permit)</i> Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	IPEA/ <u>US</u> Deposit Account No.: <u>50-0815</u> Date: <u>23 January 2002</u> Name: <u>Carol L. Francis</u> Signature: <u></u>								

Attorney's Docket No. CHOR-001 WO

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION AUTHORITY
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of: Children's Hospital & Research Center at Oakland
International Application No.: PCT/US01/23842
International Filing Date: 27 July 2001
For: Vaccines for Broad Spectrum Protection against
Diseases Caused by Neisseria Meningitidis

**REQUEST TO RECORD CHANGE OF APPLICANT
UNDER RULE 92bis IN THE INTERNATIONAL APPLICATION**

Assistant Commissioner for Patents
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Attn: IPEA/US

Sir:

Please correct the name of the applicant listed first on the above-cited application to read:

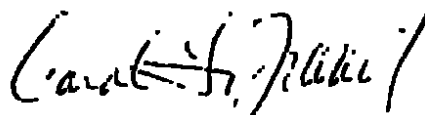
CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND

The Demand filed herewith reflects this change.

Also provided is a Power of Attorney to the undersigned executed by an officer of Children's Hospital & Research Center at Oakland

If any additional information is required, the RO/US is requested to contact the undersigned.

Respectfully submitted,


Carol L. Francis, Reg.No. 36,513

Date: 23 January 2002

Bozicevic, Field & Francis LLP
200 Middlefield Road, Suite 200
Menlo Park, CA 94025
Tel: (650) 327-3400
Fax: (650) 327-3231

PCT

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND

5700 Martin Luther King Jr. Way

Oakland, California 94609

US

hereby appoint(s) the following person as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address

(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

BOZICEVIC, Karl

FIELD, Bret E.

FRANCIS, Carol L.

SHERWOOD, Pamela J.

BORDEN, Paula A.

CANNON, Alan W.

LASALLE, Carol

HALL, Robert

HALL, Kathleen

BECKING, Frank

PHINNEY, David

Bozicevic, Field & Francis LLP

200 Middlefield Road, Suite 200

Menlo Park, California 94025

US

to represent the undersigned before

☒ all the competent International Authorities

☐ the International Searching Authority only

☐ the International Preliminary Examining Authority only

in connection with any and all international applications filed by the undersigned with the following Office: United States as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

Signatures of the Applicant(s) (where there are several applicants, each of them must sign; next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs, if such capacity is not obvious from reading the request or this power)



Name: A. H. Papp

Title: President & C.E.O.

Date: 11/15/02

Attorney's Docket No. CHOR-001WO

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION AUTHORITY
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of: Children's Hospital & Research Center at Oakland
International Application No.: PCT/US01/23842
International Filing Date: 27 July 2001
For: Vaccines for Broad Spectrum Protection against
Diseases Caused by Neisseria Meningitidis

AMENDMENT OF THE INTERNATIONAL APPLICATION
UNDER ARTICLE 34

Box PCT
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

ATTN: IPEA

Sir:

Applicant files herewith a Chapter II Demand requesting international preliminary examination. Applicant requests that the following amendments to the specification and claims be taken into account for purposes of international preliminary examination.

Amendments

Applicant amends the above-identified PCT patent application as follows:

In the Specification:

On page 57 of the specification, in the table on line 7, the ATCC Accession Nos. listed as "XX1", "XX2", "XX3", etc. have been replaced with the numbers given by the ATCC Patent Depository.

In the Claims:

Claim 36 has been amended by replacing the four "ATCC Accession No. xx" with the numbers given by the ATCC Patent Depository.

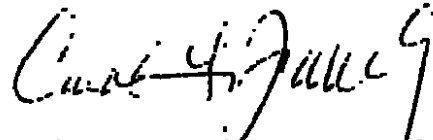
Remarks

Substitute sheets for page 57 of the specification and for page 64 of the claims, including the above amendments, are enclosed.

Conclusion

Applicant respectfully requests that the amendments be taken into account during the international preliminary examination.

Respectfully submitted,



Carol L. Francis, Reg. No. 36,513

Date: 23 January 2002

BOZICEVIC, FIELD & FRANCIS LLP
200 Middlefield Road, Suite 200
Menlo Park, California 94025
Telephone: (650) 327-3400
Fax: (650) 327-3231

or be inadvertently destroyed, or, in the case of plasmid-containing strains, lose its plasmid, it will be replaced with a viable culture(s) of the same taxonomic description.

These deposits are provided merely as a convenience to those of skill in the art, and are not an admission that a deposit is required. A license may be required to make, use, or
 5 sell the deposited materials, and no such license is hereby granted. The deposit below was received by the ATCC on or before the filing date of the present application.

Description	ATCC Accession No.
Hybridoma 1D9	PTA-3552
Hybridoma 4B11	PTA-3553
Hybridoma 9B8	PTA-3551
Hybridoma 14C7	PTA-3554
MenC strain RM1090	PTA-3557
MenB strain BZ198	PTA-3555
MenA strain Z1092	PTA-3556

molecular mass selected from the group consisting of about 80 kDa, about 59.5 kDa, about 40.7 kDa, about 39.6 kDa, about 33 kDa, about 27.9 kDa, and 14.5 kDa; and
a pharmaceutically acceptable excipient.

5 35. A composition comprising:

at least one isolated *Neisseria meningitidis* antigen, the isolated antigen being present in the composition in an amount effective to elicit an immune response in a mammalian host, and being characterized as a protein detected by Western blot with anti-sera produced following vaccination of a mammal with the composition of claim 31, and having an
10 apparent molecular mass selected from the group consisting of about 53 kDa to 57 kDa; about 46-47 kDa, about 33 kDa, about 20 kDa to 21 kDa; and about 18 kDa; and
a pharmaceutically acceptable excipient.

36. A composition comprising:

15 at least one isolated *Neisseria meningitidis* antigen, the isolated antigen being present in the composition in an amount effective to elicit an immune response in a mammalian host, wherein the antigen is from a protein that specifically binds a monoclonal antibody selected from the group consisting of 1D9 (ATCC Accession No. PTA-3552), 4B11 (ATCC
Accession No. PTA-3553), 9B8 (ATCC Accession No. PTA-3551), and 14C7 (ATCC
20 Accession No. PTA-3554); and
a pharmaceutically acceptable excipient.

37. The composition of claim 34, 35, or 36, wherein the composition comprises at least two isolated *Neisseria meningitidis* antigens.

25

38. A composition comprising isolated *Neisseria meningitidis* antigens, wherein said antigens are identified by the method of claim 28.

39. A method for eliciting broad spectrum protective immunity against a disease
30 caused by a *Neisseria meningitidis* species, said method comprising administering to a mammal the composition of claim 34, 35, 36, or 38.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
 TRAMITE

		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	MODELO DE UTILIDAD	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente		()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud		()	()
Descripción de la invención		()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes		()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas		()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()			
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial		()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño		()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas		()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()			
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado		()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.		()	()
Representación gráfica del esquema de trazado		()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas		()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable

ANDREA PASSEL

Fecha

223

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

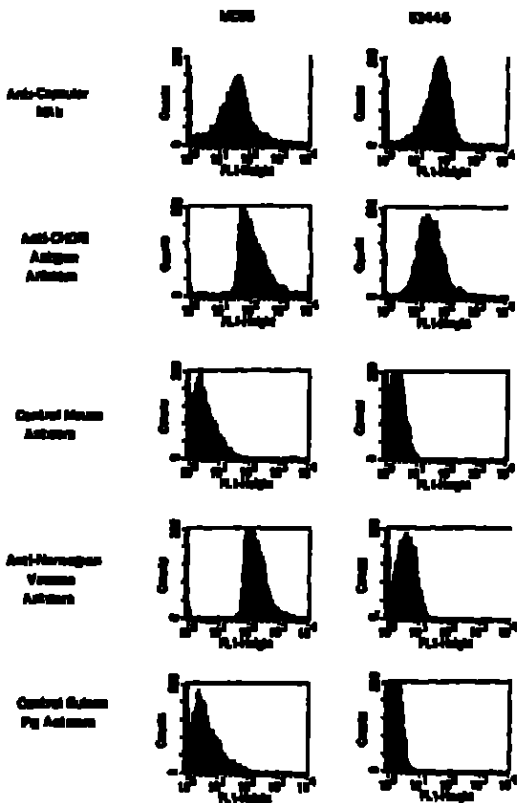
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/09643 A2

- (51) International Patent Classification: A61K
(21) International Application Number: PCT/US01/23842
(22) International Filing Date: 27 July 2001 (27.07.2001)
(23) Filing Language: English
(24) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/221,495 27 July 2000 (27.07.2000) US
(71) Applicant (for all designated States except US): THE CHILDREN'S HOSPITAL OAKLAND RESEARCH INSTITUTE [US/US]; 5700 Martha Luther King Jr. Way, Oakland, CA 94609 (US).
(72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): GRANOFF, Dan [US/US]; 1085 Creston Road, Berkeley, CA 94708 (US).
(74) Agent: FRANCIS, Carol, L.; Boricovic, Field & Francis, LLP, Suite 200, 200 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025 (US).
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GR, GU, HK, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,

[Continued on next page]

(54) Title: VACCINES FOR BROAD SPECTRUM PROTECTION AGAINST DISEASES CAUSED BY NEISSERIA MENINGITIDIS



(57) Abstract: The present invention generally provides methods and vaccines for the prevention of diseases caused by Neisseria meningitidis bacteria, particularly serogroup B strains.

WO 02/09643 A2



2020
Bogotá, D.C.,

0224

Doctor:
Margarita Castellanos Abondano
Apoderado
Children's Hospital & Research Center at Oakland

Oficio N° 07240

ASUNTO:	Radicación N°	03-4732
	Solicitud internacional	PCT/US2001/23842
	Fecha inicio fase nacional	27/02/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene el certificado de depósito del material biológico. (Art. 26-j) Decisión 486). Adicionalmente debe especificar los números de acceso del material biológico.
- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art.27-c) Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 05 SET. 2003