

BT



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

- PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL -

04-123996

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO

" COMPOSICION VACUNAL "

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INSTITUTO FINLAY, CENTRO DE INVESTIGACION - PRODUCCION DE VACUNAS Y SUEROS y GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A.

DOMICILIO

Ave. 27 No. 19805 e/198 y 202, La Coronela, La Lisa. Ciudad Habana 13500, CUBA y Rue de L'Institut 89, B-1330 Rixensart, BELGICA

74. APODERADO

DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

22. BOGOTA, D.C.,



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04123996 00000000

Folios: 60

Fecha (DD): 2004-12-10 15:27:09

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

①

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

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: INSTITUTO FINLAY. CENTRO DE INVESTIGACION - PRODUCCION DE VACUNAS Y SUEROS y GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A.
Dirección: Ave. 27 No. 18805 e/ 198 y 202, La Coronela, La Lisa, Ciudad Habana 13600, CUBA y Rue de L'Institut 89, B-1330 Rixensart, BELGICA
Nacionalidad o Domicilio: La Habana - CUBA y Rixensart - BELGICA
Lugar de Constitución: CUBA y BELGICA

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CARRERA 9 No. 93-09

Teléfono: 610 74 80 Fax: 610 07 06

E-mail: acastelli@impant.net.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐Número 39779.854 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: (VER ANEXO No. 1)

Dirección:

Nacionalidad o Domicilio (VER ANEXO No. 1)

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP03/08094Fecha 10/06/2003Publicación Internacional No. WO 03/105890 A2Fecha 24/12/2003

⑥

Título (54)

"COMPOSICION VACUNAL"

Título

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/00

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

13/06/2002

(31) Número de Solicitud

0213622.4

⑨

Comprobante de pago No.

04-91.515

Fecha

Noviembre 25, 2004

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

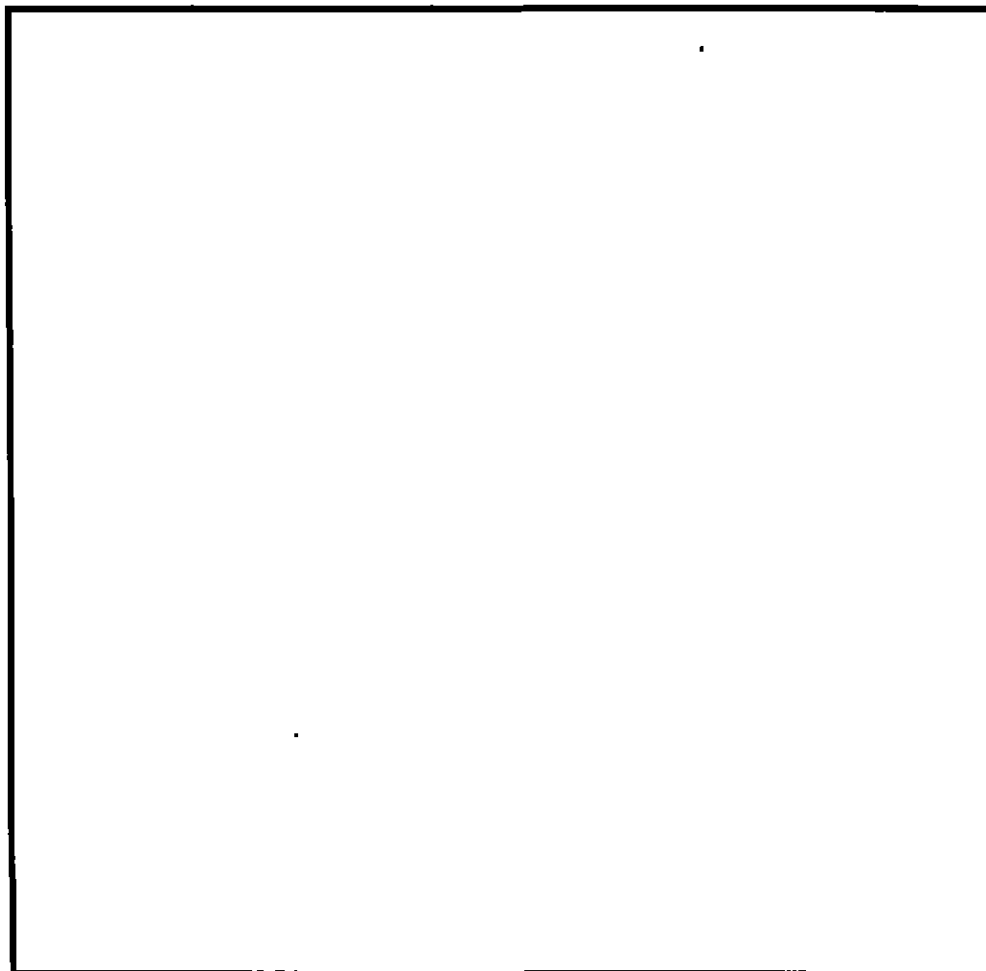
⑩

Anexos

- ☒ 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, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ 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

⑪

FIGURA CARACTERISTICA:



⑫

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

C.C. No. 39.779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

10 DIC. 2004

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 9 No. 83-08
Apartado 6348
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO No. 1

INVENTORES

NOMBRE	DIRECCION	NACIONALIDAD
1. RAMON FAUSTINO BARBERA MORALES	Finlay Institute, Ave 27 No. 19805, La Coronela, La Lisa, Ciudad de la Habana, CUBA	CUBANO
2. PIERRE MICHEL DESMONS	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de L'Institut 89, B-1330 Rixensart, BELGICA	BELGA
3. FRANCISCO JESUS DOMINGUEZ ALVAREZ	Finlay Institute, Ave 27 No. 19805, La Coronela, La Lisa, Ciudad de la Habana, CUBA	CUBANO
4. JAN POOLMAN	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de L'Institut 89, B-1330 Rixensart, BELGICA	HOLANDES

49554

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacon : C-123996 00000000 Folios: 68
Fecha (IMP): 2004-12-18 15:27:09
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 91,515
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	23204255	25/11/2004	696,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 December 2003 (24.12.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/105890 A2

(51) International Patent Classification: A61K 39/00

POOLMAN, Jan [NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(21) International Application Number: PCT/EP03/06094

(74) Agent: LUBIENSKI, Michael, John; GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(22) International Filing Date: 10 June 2003 (10.06.2003)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (*national*): AR, AG, AI, 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, GD, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MZ, NL, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0213622.4 13 June 2002 (13.06.2002) GB

(71) Applicants (*for all designated States except US*): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). INSTITUTO FINLAY [CU/CU]; Centro de Investigacion-Produccion de Sueros y Vacunas, Ave 27 No. 19805, La Coronela, La Lisa Ciudad de la Habana (CU).

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR). OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): BARBERA MORALES, Ramon, Faustino [CU/CU]; Finlay Institute, Ave 27 No. 19805, La Coronela, La Lisa Ciudad de la Habana (CU). DESMONS, Pierre, Michel [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). DOMINGUEZ ALVAREZ, Francisco, Jesus [CU/CU]; Finlay Institute, Ave 27 No. 19805, La Coronela, La Lisa Ciudad de la Habana (CU).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: VACCINE COMPOSITION

(57) Abstract: The present invention relates to vaccine compositions for the effective prevention or treatment of meningococcal, preferably meningococcal, disease. The vaccines of the invention comprise a multivalent meningococcal blend composition comprising at least one blb with homologous bactericidal activity which is derived from a meningococcal strain with a serosubtype that is prevalent in a country of use, and at least one blb with heterologous bactericidal activity which is derived from a meningococcal strain which need not have a serosubtype that is prevalent in the country of use.

WO 03/105890 A2

VACCINE COMPOSITION

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of neisserial vaccine compositions, their manufacture, and the use of such compositions in medicine. More particularly it relates to the field of novel multivalent meningococcal outer-membrane vesicle (or bleb) vaccines, and advantageous methods of rendering such vaccines more effective.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Neisseria meningitidis (meningococcus) is a Gram-negative bacterium frequently isolated from the human upper respiratory tract. It occasionally causes invasive bacterial diseases such as bacteremia and meningitis. The incidence of meningococcal disease shows geographical seasonal and annual differences (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). Most disease in temperate countries is due to strains of serogroup B and varies in incidence from 1-10/100,000/year total population sometimes reaching higher values (Kaczmarek, E.B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. et al. Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., et al. Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990). Age-specific incidences in the two high risk-groups, infants and teenagers, reach higher levels.

Epidemics dominated by serogroup A meningococci occur, mostly in central Africa, sometimes reaching levels up to 1000/100,000/year (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). Nearly all cases of meningococcal disease as a whole are caused by serogroup A, B, C, W-135 and Y meningococci. A tetravalent A, C, W-135, Y capsular polysaccharide vaccine is available (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982).

The polysaccharide vaccines are currently being improved by way of chemically conjugating them to carrier proteins (Lieberman, J.M., Chin, S.S., Wong, V.K., et al. JAMA 275 : 1499-1503, 1996). A serogroup B vaccine is not available, since the B capsular polysaccharide is non-immunogenic, most likely because it shares structural similarity to host components (Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L. et

al. J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Mäkelä, P.M. Lancet ii.: 355-357, 1983).

Therefore, for many years efforts have been focused on developing meningococcal outer membrane vesicle (or bleb) based vaccines (de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C. et al. Lancet 340: 1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E.A. Gronnesby, J.K. et al. 338: 1093-1096, 1991). Such vaccines have the advantage of including several integral outer-membrane proteins in a properly folded conformation which can elicit a protective immunological response when administered to a host. In addition, *Neisseria* strains (including *N. meningitidis* serogroup B - menB) excrete outer membrane blebs in sufficient quantities to allow their manufacture on an industrial scale. Alternatively, blebs may be prepared by known methods comprising a detergent extraction of the bacterial cells (EP 11243), which has the benefit of removing some endotoxin (lipo-polysaccharides - or LPS; also called lipo-oligosaccharide - or LOS) from the vaccine.

Such multicomponent outer-membrane protein vaccines derived from wild-type menB strains have demonstrated efficacies from 57% - 85% in older children (>4 years) and adolescents and have become registered in Latin America. Most of these efficacy trials were performed with menB OMVs (outer membrane vesicles) made via a detergent extraction process.

Many bacterial outer membrane components are present in these vaccines, such as PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB and the contribution of these components to the observed protection still needs further definition. Other bacterial outer membrane components have been defined (using animal or human antibodies) as potentially being relevant to the induction of protective immunity, such as TbpB, NspA (Martin, D., Cadioux, N., Hamel, J., Brodeux, B.R., J. Exp. Med. 185: 1173-1183, 1997; Lissolo, L., Maftre-Wilmotte, C., Dumas, p. et al., Inf. Immun. 63: 884-890, 1995). The mechanism of protective immunity will involve antibody mediated bactericidal activity and opsonophagocytosis.

The frequency of *Neisseria meningitidis* infections has risen in the past few decades in many European countries. This has been attributed to increased transmission due to an increase in social activities (for instance swimming pools, theatres, etc.). It is no longer uncommon to isolate *Neisseria meningitidis* strains that are less sensitive or resistant to some of the standard antibiotics.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to vaccine compositions for the effective prevention or treatment of neisserial, preferably meningococcal, disease. The vaccines of the invention comprise a multivalent meningococcal bleb composition comprising at least one bleb with homologous bactericidal activity which is derived from a meningococcal strain with a serosubtype (PorA immunotype) that is prevalent in a country of use, and at least one bleb with heterologous bactericidal activity which is derived from a meningococcal strain which need not have a serosubtype that is prevalent in the country of use.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

The subject matter of and information disclosed within the publications and patents or patent applications mentioned in this specification are incorporated by reference herein. It should be understood that the word "comprising" used herein may be substituted for the term "consisting of" in all instances whilst still remaining within the scope of the invention.

The present inventors have found a solution to the problem of currently available meningococcal bleb vaccines only providing satisfactory Serum Bactericidal Activity (SBA) against homologous strains (to the strain from which the blebs were derived) and not satisfactory SBAs against heterologous strains. Usually the blebs in the art are derived from strains prevalent in a particular country or region. Although homologous protection is reasonable, the risk of an unprotected heterologous strain quickly gaining in prevalence is high, particularly in young children.

The present inventors have found that particular multi-valent bleb vaccine compositions (i.e. compositions comprising at least 2 different blebs) can provide a host with satisfactory SBAs against homologous and heterologous strains of *Neisseria* (particularly meningococcus). Such vaccines are advantageous in that rather than providing an expensive bleb vaccine made with many different blebs derived from all/most meningococcal strains infecting individuals in a country, the vaccines of the invention provide a good compromise by minimising the number of blebs in a vaccine, whilst still providing good specific and general protection against prevalent

strains and against mutation of these strains or the introduction of new serogroup B strains when cases from prevalent strains are reduced.

Therefore in one aspect the present invention provides a multivalent meningococcal bleb composition comprising at least one (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7) bleb preparation with homologous bactericidal activity which is derived from a meningococcal strain with a serosubtype (PorA immunotype) that is prevalent in a country of use, and at least one (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7) bleb preparation with heterologous bactericidal activity which is derived from a meningococcal strain which need not have a serosubtype that is prevalent in the country of use.

By a "meningococcus strain with a serosubtype that is prevalent in a country of use" it is meant the bleb is derived from a meningococcal strain with a serosubtype which is most prevalent (or possibly second or third or fourth prevalent – particularly if 2 or 3 or 4 bleb preparations with homologous bactericidal activity are incorporated in the vaccine) in percentage terms amongst strains of all serosubtypes which cause meningococcal disease in the country (or region or continent) – i.e. strains isolated during laboratory-based active surveillance of meningococcal disease in a country, region or continent. Preferably the serosubtype of such a bleb constitutes more than 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 or 60 % of all serosubtypes which cause meningococcal disease in the country (or region or continent).

If one bleb preparation with homologous bactericidal activity is included in the composition it is preferred that it is derived from a strain with a subserotype which is most prevalent in the country (or region or continent), if two or three or four are included then it is preferred that the strains used cover the two or three or four (respectively) most prevalent subserotypes.

By a "meningococcal strain which need not have a serosubtype that is prevalent in the country of use" it is meant that the bleb can be (but not necessarily be) derived from a meningococcal strain which is not from the most prevalent (or second, third, fourth, fifth or sixth) serosubtype in percentage terms amongst strains of all serosubtypes which cause meningococcal disease in the country (or region or continent) – i.e. strains isolated during laboratory-based active surveillance of sporadic cases of meningococcal disease in a country, region or continent. In such case, it is preferable that the serosubtype of such a bleb constitutes less than 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 or 60 % of all serosubtypes which cause meningococcal disease in the country (or region or continent).

By "derived from a meningococcal strain" it is meant that the bleb is isolated from the meningococcal strain using any known method – such as a detergent-free isolation, or processes which involve detergent (such as deoxycholate) in the isolation.

By bleb preparations that have "homologous bactericidal activity" or "heterologous bactericidal activity" it is meant that the bleb preparations elicit satisfactory serum bactericidal activities (SBA) when administered to a host against homologous or heterologous meningococcal strains, respectively.

SBA is the most commonly agreed immunological marker to estimate the efficacy of a meningococcal vaccine (Perkins et al. J Infect Dis. 1998, 177:683-691). Satisfactory SBA can be ascertained by any known method. Preferably a blood sample is taken prior to the first vaccination, two months after the second vaccination and one month after the third vaccination (three vaccinations in one year being a typical human primary vaccination schedule administered at, for instance, 0, 2 and 4 months, or 0, 1 and 6 months). Such human primary vaccination schedules can be carried out on infants under 1 year old (for instance at the same time as Hib vaccinations are carried out) or 2-4 year olds or adolescents may also be vaccinated to test SBA with such a primary vaccination schedule. A further blood sample may be taken 6 to 12 months after primary vaccination and one month after a booster dose, if applicable.

SBA will be satisfactory for a bleb preparation with homologous bactericidal activity if one month after the third vaccine dose (of the primary vaccination schedule) (in 2-4 year old humans or adolescents, but preferably in infants in the first year of life) the percentage of subjects with a four-fold increase in terms of SBA (antibody dilution) titre (compared with pre-vaccination titre) against the strain of meningococcus from which the bleb was derived is greater than 30%, preferably greater than 40%, more preferably greater than 50%, and most preferably greater than 60% of the subjects.

Of course a bleb preparation with heterologous bactericidal activity can also constitute bleb preparation with homologous bactericidal activity if it can also elicit satisfactory SBA against the meningococcal strain from which it is derived.

SBA will be satisfactory for a bleb preparation with heterologous bactericidal activity if one month after the third vaccine dose (of the primary vaccination schedule)

(in 2-4 year old humans or adolescents, but preferably in infants in the first year of life) the percentage of subjects with a four-fold increase in terms of SBA (antibody dilution) titre (compared with pre-vaccination titre) against three heterologous strains of meningococcus is greater than 20%, preferably greater than 30%, more preferably greater than 35%, and most preferably greater than 40% of the subjects. Such a test is a good indication of whether the bleb preparation with heterologous bactericidal activity can induce cross-bactericidal antibodies against various meningococcal strains. The three heterologous strains should preferably have different electrophoretic type (ET)-complex or multilocus sequence typing (MLST) pattern (see Maiden et al. PNAS USA 1998, 95:3140-5) to each other and preferably to the strain from which the bleb preparation with heterologous bactericidal activity is made. A skilled person will readily be able to determine three strains with different ET-complex which reflect the genetic diversity observed amongst meningococci, particularly amongst meningococcus type B strains that are recognised as being the cause of significant disease burden and/or that represent recognised *MenB* hyper-virulent lineages (see Maiden et al. *supra*). For instance three strains that could be used are the following: BZ10 (B:2b:P1.2) belonging to the A-4 cluster; B16B6 (B:2a:P1.2) belonging to the ET-37 complex; and H44/76 (B:15:P1.7,16) belonging to the ET-5 complex, or any other strains belonging to the same ET/Cluster. Such strains may be used for testing a bleb preparation with heterologous bactericidal activity made from, for instance, meningococcal strain CU385 (B:4:P1.15) which belongs to the ET-5 complex. Another sample strain that could be used (for instance instead of any of the 3 test strains mentioned above) is from the Lineage 3 epidemic clone (e.g. NZ124 [B:4:P1.7,4]). Another ET-37 strain that could be used interchangeably with B16B6 is NGP165 (B:2a:P1.2).

Processes for measuring SBA activity are known in the art. For instance a method that might be used is described in WO 99/09176 in Example 10C. In general terms, a culture of the strain to be tested is grown (preferably in conditions of iron depletion – by addition of an iron chelator such as EDDA to the growth medium) in the log phase of growth. This can be suspended in a medium with BSA (such as Hanks medium with 0.3% BSA) in order to obtain a working cell suspension adjusted to approximately 20000 CFU/ml. A series of reaction mixes can be made mixing a series of two-fold dilutions of sera to be tested (preferably heat-inactivated at 56°C for

30 min) [for example in a 50 μ l/well volume] and the 20000 CFU/ml meningococcal strain suspension to be tested [for example in a 25 μ l/well volume]. The reaction vials should be incubated (e.g. 37°C for 15 minutes) and shaken (e.g. at 210 rpm). The final reaction mixture [for example in a 100 μ l volume] additionally contains a complement source [such as 25 % final volume of pretested baby rabbit serum], and is incubated as above [e.g. 37°C for 60 min]. For human SBA serology, human serum is usually used as the source of complement rather than baby rabbit complement, and the buffer used is PBS MgCl₂ 0.5 mM CaCl₂ 0.9 mM glucose 0.1% pH 7.4. A sterile polystyrene U-bottom 96-well microtiter plate can be used for this assay. A aliquot [e.g. 10 μ l] can be taken from each well using a multichannel pipette, and dropped onto Mueller-Hinton agar plates (preferably containing 1 % Isovitalex and 1 % heat-inactivated Horse Serum) and incubated (for example for 18 hours at 37°C in 5 % CO₂). Preferably, individual colonies can be counted up to 80 CFU per aliquot. The following three test samples can be used as controls: buffer + bacteria + complement; buffer + bacteria + inactivated complement; serum + bacteria + inactivated complement. SBA titers can be straightforwardly calculated using a program which processes the data to give a measurement of the dilution which corresponds to 50 % of cell killing by a regression calculation.

In a further aspect of the invention the present inventors have found that the bleb preparation with heterologous bactericidal activity of the invention can achieve its cross-bactericidal properties by being deficient in immunodominant outer membrane proteins (OMPs) compared to normal wild-type bleb preparations.

Thus the present invention also provides a multivalent meningococcal bleb composition of the invention wherein the bleb with heterologous bactericidal activity is deficient in an immunodominant outer membrane protein compared to blebs derived from a comparator strain (for instance wild-type MC58, but preferably wild-type strain H44/76), and the bleb with homologous bactericidal activity is not deficient to the same degree (or preferably at all) in said immunodominant outer membrane protein compared to blebs derived from the same comparator strain.

A skilled person will readily understand what is an immunodominant OMP, but it is preferred that the immunodominant OMP of the invention has highly immunogenic, surface-exposed epitopes (preferably within surface-exposed loop sequences) and is one of the top 10 highly-expressed OMPs (either by weight or by

No. of molecules per cell) on the meningococcal surface. Usually these OMPs are highly immunogenic, but are quite variable in the amino acid sequence of their loop structures from strain to strain. Examples of such OMPs are detailed below.

By "deficient" it is meant that the bleb preparation with heterologous bactericidal activity of the invention has less of the immunodominant OMP of the invention on its surface than blebs made from the comparator strain. In particular the bleb preparation with heterologous bactericidal activity should have less than 98, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, or 5% of the amount of the immunodominant OMP as compared to the same quantity of bleb (as measured by total protein, usually around 10 µg of protein) prepared from the comparator strain. This can be assessed, for instance, by OMP band densitometry on an SDS-PAGE gel, for example as described in Example 4. Most preferably the bleb preparation with heterologous bactericidal activity of the invention should have none of the immunodominant OMP. The above is also the definition of "deficient" where this document compares the level of immunodominant OMP on the surface of the bleb production strain with respect to the comparator strain. A bleb or strain may, optionally, also be deficient in the immunodominant OMP if the OMP is engineered not to be surface-exposed on the outer membrane of the bleb/strain, or if the OMP is expressed at the same level but one or more surface-exposed loops are engineered to be less variable or immunodominant by their replacement, mutation or deletion in order to give blebs made from such a strain more heterologous bactericidal activity.

Preferably the process of deriving the bleb preparation with heterologous bactericidal activity from the source meningococcal strain is the same as that used to derive the blebs from the comparator strain (preferably the method described in Frederiksen et al. NIPH Annals. 1991, 14:67-80). This need not be the case, however, particularly if the reason for the bleb preparation with heterologous bactericidal activity being deficient in the immunodominant OMP is due to the way that the blebs are produced. In such case the standard procedure for bleb production for the comparator strain is the method as described in Frederiksen et al. (NIPH Annals. 1991, 14:67-80) or Bjune et al. (NIPH Annals 1991 14:81-93).

The bleb with heterologous bactericidal activity may be derived from a wild-type meningococcal strain that is naturally deficient in the immunodominant outer

membrane protein, or may be derived from meningococcal strains rendered deficient in the immunodominant outer membrane protein.

In particular, the bleb with heterologous bactericidal activity can be rendered deficient in the immunodominant outer membrane protein by genetically-engineering the production strain to be deficient in the OMP or to produce less or none of the OMP compared to the wild-type strain from which it is engineered.

By "less or none" it is meant in particular that the strain expresses less than 98, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, or 5% of the amount of the immunodominant OMP on its surface as compared to the wild-type strain from which it was engineered. Most preferably the engineered strain does not express any of the immunodominant OMP. A strain may also have less or no immunodominant OMP if the OMP is engineered not to be surface-exposed on the outer membrane of the strain, or, optionally, if the OMP is expressed at the same level but one or more surface-exposed loops are engineered to be less variable or immunodominant by their replacement, mutation or deletion in order to give blebs made from such a strain more heterologous bactericidal activity.

The gene encoding the immunodominant OMP of the invention may be engineered in the above way by known techniques. In particular the meningococcal strain may be genetically altered in either the promoter or coding region of the gene such that the strain produces less or none of said immunodominant outer membrane protein. Particular ways that this may be achieved are described in WO 01/09350. For instance a transposon (or other sequence) may be inserted to disrupt the coding region or promoter region of the gene, or point mutations or deletions may achieve a similar result. The promoter or coding region may be deleted completely or in part in order to render the product of the gene less immunodominant (for instance by replacing, mutating, or deleting immunogenic epitopes present in the surface-exposed loops). Recombination events can be used to delete, insert, replace or mutate sequences in the OMP to render them less immunodominant such as the replacement of a strong promoter for a weaker (or no) promoter. Frameshift mutations may also be inserted into the coding region.

Without wishing to be bound by theory, it is thought that the combination of such a bleb with a bleb with homologous bactericidal activity is effective as a vaccine, as the bleb with homologous bactericidal activity is effective against prevalent strains

in a country of use by virtue of bactericidal antibodies being generated against the immunodominant (but variable) OMP of the invention, however because the immunodominant OMP of the invention can immunologically mask the efficacy of more conserved antigens present on the bleb surface (which are present at lower levels), the bleb with homologous bactericidal activity does not have satisfactory heterologous bactericidal activity, with the above disadvantages. The bleb with heterologous bactericidal activity of the invention has this masking removed to some degree so that the conserved OMPs present at low level in the blebs have more influence on the host's immune system, and can thus elicit cross-bactericidal antibodies in a host with satisfactory heterologous bactericidal activity. The combination of both types of bleb provides a preparation that can be formulated into an optimal vaccine for use in a particular country or region.

Preferably the bleb with heterologous bactericidal activity is deficient in (or has been engineered to have less or none of) an immunodominant OMP which is one or more of the following antigens: PorA, PorB, OpC, OpA or PilC. Preferably the bleb is deficient in (or has been engineered to have less or none of) PorA.

A preferred bleb preparation with heterologous bactericidal activity of the invention that is naturally deficient in PorA is a bleb preparation isolated from meningococcal strain CU-385 (B:4:P1.19,15), preferably isolated by the method disclosed in EP 301992-B. PorA is deficient in this strain or bleb compared to the comparator strain or bleb (e.g. H44/76). Bleb preparations from this strain (or blebs from similar strains with equivalent or lower levels of PorA [e.g. less than 25, 22, 20, 15, 10 or 5 % PorA of total bleb protein] as compared with CU-385 or CU-385 blebs) have been found to be well-suited to be combined with bleb preparations with homologous bactericidal activity with normal (equivalent or greater – e.g. more than 28, 30, 35, or 40% PorA of total bleb protein) levels of PorA as compared with H44/76 blebs. Such bleb combinations (particularly those comprising CU-385 blebs) are thus preferred bleb combinations of the present invention. Preferably PorA quantities are assessed in the final bleb preparations.

30

Furthermore, the bleb with heterologous bactericidal activity of the invention may be further improved in terms of its cross-bactericidal (satisfactory SBA)

properties. This may be achieved by enhancing the quantity of certain OMPs on the surface of said bleb.

Accordingly, the bleb with heterologous bactericidal activity of the invention as hereinbefore described is preferably derived from an engineered meningococcal strain which has upregulated expression of one or more of the following genes (either
 5 by adding an extra copy of the gene to the strain, or by inserting a stronger promoter upstream of the existing gene, or any other way described in WO 01/09350): NspA (WO 96/29412), Hsf-like or truncates thereof (WO 99/31132 & WO 01/55182; also known as NhhA), Hsp (PCT/EP99/02766), OMP85 (WO 00/23595), PilQ
 10 (PCT/EP99/03603), PldA (PCT/EP99/06718), FrpB (WO 96/31618), TbpA (WO92/03467, US5912336, WO93/06861 and EP586266), TbpB (WO93/06861 and EP586266), NadA (Comanducci et al J. Exp. Med. 2002 195: 1445-1454), FrpA and/or FrpC (WO 92/01460; Thompson et al., (1993) J. Bacteriol. 175:811-818; Thompson et al., (1993) Infect. Immun. 61:2906-2911), LbpA, LbpB
 15 (PCT/EP98/05117), FhaB (WO98/02547, SEQ ID NO 38 [nucleotides 3083-9025]), HsaR (PCT/EP99/05989), lipo02 (PCT/EP99/08315), Tbp2 (WO 99/57280), MltA (WO 99/57280), TspA (WO 00/03003), TspB (WO 00/03003) and ctrA (PCT/EP00/00135).

"Upregulated expression" refers to any means to enhance the expression of an
 20 antigen of interest, relative to that of the non-modified (i.e., naturally occurring) bleb or strain. It is understood that the amount of 'upregulation' will vary depending on the particular antigen of interest but will not exceed an amount that will disrupt the membrane integrity of the bleb. Upregulation of an antigen refers to expression that is at least 10% higher than that of the non-modified bleb or strain. Preferably it is at
 25 least 50% higher. More preferably it is at least 100% (2, 3, 5 or 10 fold) higher.

It should be understood that multivalent bleb preparations (or vaccines comprising such preparations) of the prior art which may have the characteristics of the multivalent bleb preparations of the present invention are not claimed; for instance any particular multivalent bleb preparations disclosed in WO 01/09350 (such as a
 30 combination consisting of blebs derived from all of the following menB strains: H44/76, M97/252078, BZ10, NGP165 and CU385, or combinations consisting of blebs from CU385 and one or more bleb preparations derived from one or more of the other 4 strains) are not claimed, nor are any particular multivalent bleb preparations

disclosed in WO 02/09643 (such as a combination consisting of blebs derived from all of the following meningococcal strains: MenC RM1090, MenB BZ198, MenA Z1092, or combinations consisting of a pair of bleb preparations derived from any pair of these 3 strains), nor are any particular multivalent bleb preparations disclosed in WO
5 01/91788.

Vaccine Formulations

A preferred embodiment of the invention is the formulation of the multivalent bleb compositions of the invention in a vaccine for the treatment or prevention of
10 neisserial (preferably meningococcal) disease which may also comprise a pharmaceutically acceptable excipient.

The manufacture of bleb preparations from any of the aforementioned strains (unless otherwise stated) may be achieved by any of the methods well known to a skilled person. Preferably the methods disclosed in EP 301992, US 5,597,572, EP
15 11243 or US 4,271,147, Frederikson et al. (NIPH Annals [1991], 14:67-80), Zollinger et al. (J. Clin. Invest. [1979], 63:836-848), Saunders et al. (Infect. Immun. [1999], 67:113-119), Drabick et al. (Vaccine [2000], 18:160-172) or WO 01/09350 (Example 8) are used. In general, OMVs are extracted with a detergent, preferably deoxycholate, and nucleic acids are optionally removed enzymatically. Purification is achieved by
20 ultracentrifugation optionally followed by size exclusion chromatography. The 2 or more different blebs of the invention may be combined in a single container to form a multivalent preparation of the invention (although a preparation is also considered multivalent if the different blebs of the invention are separate compositions in separate containers which are administered at the same time [the same visit to a practitioner] to
25 a host). OMV preparations are usually sterilised by filtration through a 0.2 µm filter, and are preferably stored in a sucrose solution (e.g. 3%) which is known to stabilise the bleb preparations.

It should be noted that the blebs constituting the multivalent bleb preparations of the invention are derived from genetically diverse strains (i.e. a comparison of all
30 the bleb-producing strains used to make the preparations of the invention shows that more than 3 % of the open-reading frames of the genome of any given strain have genetic differences with the respective open-reading frames of the genomes of the

other strains used). Most preferably, however, the multivalent bleb preparations of the invention are derived entirely from meningococcus B strains.

Vaccine preparation is generally described in Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York).

The multivalent bleb compositions of the present invention may be adjuvanted in the vaccine formulation of the invention. Suitable adjuvants include an aluminium salt such as aluminum hydroxide gel, alum, or aluminium phosphate (preferably aluminium hydroxide), but may also be a salt of calcium (particularly calcium carbonate), iron or zinc, or may be an insoluble suspension of acylated tyrosine, or acylated sugars, cationically or anionically derivatised polysaccharides, or polyphosphazenes.

Suitable Th1 adjuvant systems that may be used include, Monophosphoryl lipid A, particularly 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (or other non-toxic derivatives of LPS), and a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL) [or non toxic LPS derivatives] together with an aluminium salt. An enhanced system involves the combination of a monophosphoryl lipid A and a saponin derivative particularly the combination of QS21 [or other saponin] and 3D-MPL [or non toxic LPS derivative] as disclosed in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 [or saponin] is quenched with cholesterol as disclosed in WO96/33739. A particularly potent adjuvant formulation involving QS21, 3D-MPL and tocopherol in an oil in water emulsion is described in WO95/17210 and is a preferred formulation.

The vaccine may comprise a saponin, more preferably QS21. It may also comprise an oil in water emulsion and tocopherol. Unmethylated CpG containing oligo nucleotides (WO 96/02555) are also preferential inducers of a TH1 response and are suitable for use in the present invention.

The vaccine preparation of the present invention may be used to protect or treat a mammal susceptible to infection, by means of administering said vaccine via systemic or mucosal route. These administrations may include injection *via* the intramuscular, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous routes; or *via* mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory, genitourinary tracts. Thus one aspect of the present invention is a method of immunizing a human host against a

disease caused by neisserial (preferably meningococcal) bacteria, which method comprises administering to the host an immunoprotective dose of the multivalent bleb preparation of the present invention.

The amount of bleb in each vaccine dose is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in typical vaccinees. Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and how it is presented. Generally, it is expected that each dose will comprise 1-100 μ g of each bleb (in terms of protein), preferably 5-50 μ g, and most typically in the range 5 - 25 μ g. Therefore for a bivalent bleb vaccine of the invention each dose may typically include 2 x 25 μ g of bleb.

An optimal amount of each bleb in a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial (primary) vaccination (typically 3 administrations, preferably in the first year of life or within a single year during adolescence, for instance at 0, 2 and 4 months, or 0, 1 and 6 months), subjects may receive one or several booster immunisations (after 1 year following the first primary administration) adequately spaced. The vaccine of the invention may be used to immunize babies in the first year of life, 2-4 year olds, or adolescents. It is particularly advantageous in eliciting satisfactory heterologous bactericidal activity in babies in the first year of life.

Ghost or Killed Whole cell vaccines

The inventors envisage that the above improvements to multivalent bleb preparations and vaccines can be easily extended to ghost or killed whole cell preparations and vaccines (with identical advantages). The meningococcal strains used to make the multivalent bleb preparations of the invention can also be used to make multivalent ghost and killed whole cell preparations. Methods of making ghost preparations (empty cells with intact envelopes) from Gram-negative strains are well known in the art (see for example WO 92/01791). Methods of killing whole cells to make inactivated cell preparations for use in vaccines are also well known. The terms 'bleb preparations' and 'bleb vaccines' as well as the processes described throughout this document are therefore applicable to the terms 'ghost preparation' and 'ghost vaccine', and 'killed whole cell preparation' and 'killed whole cell vaccine', respectively, for the purposes of this invention.

Preferred Vaccine Compositions of the invention

A preferred vaccine of the invention as described above which is particularly suitable for use in a vaccination program in New Zealand or Europe (preferably the European Union) comprises a multivalent bleb composition of the invention where the bleb with homologous bactericidal activity is derived from a meningococcal strain with a serosubtype of P1.4.

A preferred vaccine of the invention as described above which is particularly suitable for use in a vaccination program in USA comprises a multivalent bleb composition of the invention where the bleb with homologous bactericidal activity is derived from a meningococcal strain with a serosubtype of P1.7,16, and optionally further blebs with homologous bactericidal activity are also included derived from one or more (2, 3 or all 4) meningococcal strains with serosubtypes selected from the following list: P1.7,1 ; P1.5,2 ; P1.22a,14 ; and P1.14.

A preferred vaccine of the invention as described above which is particularly suitable for use in a vaccination program in Norway comprises a multivalent bleb composition of the invention where the bleb with homologous bactericidal activity is derived from a meningococcal strain with a serosubtype of P1.16.

For all the above vaccines, the bleb with heterologous bactericidal activity that the vaccine comprises is preferably derived from strain CU-385 (or similar strains or bleb preparations which have equivalent or less PorA than CU-385 or CU-385 blebs, respectively, as described herein). As described above, it is then further preferred that the above-listed bleb with homologous bactericidal activity or the strain from which it is derived has equivalent or more PorA than H44/76 bleb, or strain, respectively. Preferably PorA quantities are assessed in the final bleb preparations.

Vaccine Combinations

A further aspect of the invention is vaccine combinations comprising the multivalent bleb preparations or vaccines of the invention with other antigens which are advantageously used against certain disease states. It has been found that blebs are particularly suitable for formulating with other antigens, as they advantageously have an adjuvant effect on the antigens they are mixed with.

In one preferred combination, the multivalent meningococcal bleb preparations or vaccines of the invention are formulated with 1, 2, 3 or preferably all 4 of the following meningococcal capsular polysaccharides which may be plain or conjugated to a carrier comprising T-cell epitopes (preferably a protein carrier such as tetanus toxoid, diphtheria toxoid, or CRM197): A, C, Y or W. The term "polysaccharide" is intended to cover unsized or sized polysaccharides, or sized oligosaccharides. Preferably at least C and Y are included in a European vaccine, at least C is included in a US vaccine, and at least A and C are included in a vaccine for an African, South American, or equatorial country. Such a vaccine may be advantageously used as a global meningococcus vaccine.

In a further preferred embodiment, the multivalent bleb preparations or vaccines of the invention (preferably formulated with 1, 2, 3 or all 4 of the plain or conjugated meningococcal capsular polysaccharides A, C, Y or W) are formulated with a conjugated *H. influenzae* b capsular polysaccharide, and/or one or more plain or conjugated pneumococcal capsular polysaccharides. Optionally, the vaccine may also comprise one or more protein antigens that can protect a host against *Streptococcus pneumoniae* infection. Such a vaccine may be advantageously used as a global meningitis vaccine.

The pneumococcal capsular polysaccharide antigens are preferably selected from serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F and 33F (most preferably from serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F).

Preferred pneumococcal proteins antigens are those pneumococcal proteins which are exposed on the outer surface of the pneumococcus (capable of being recognised by a host's immune system during at least part of the life cycle of the pneumococcus), or are proteins which are secreted or released by the pneumococcus. Most preferably, the protein is a toxin, adhesin, 2-component signal transducer, or lipoprotein of *Streptococcus pneumoniae*, or truncate or immunologically functional equivalent thereof. Particularly preferred proteins include, but are not limited to: pneumolysin (preferably detoxified by chemical treatment or mutation) [Mitchell *et al.* Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.", Mitchell *et al.* Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007(1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in

Escherichia coli: rapid purification and biological properties.", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton et al), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA and transmembrane deletion variants thereof (US 5804193 - Briles et al.); PspC and transmembrane deletion variants thereof (WO 97/09994 - Briles et al); PsaA and transmembrane deletion variants thereof (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); pneumococcal choline binding proteins and transmembrane deletion variants thereof; CbpA and transmembrane deletion variants thereof (WO 97/41151; WO 99/51266); Glyceraldehyde-3-phosphate - dehydrogenase (Infect. Immun. 1996 64:3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato et al. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164:207-14); M like protein, SB patent application No. EP 0837130; and adhesin 18627, SB Patent application No. EP 0834568. Further preferred pneumococcal protein antigens are those disclosed in WO 98/18931, particularly those selected in WO 98/18930 and PCT/US99/30390.

Further preferred *Streptococcus pneumoniae* protein antigens of the invention are selected from the group consisting of: Poly Histidine Triad family (Pht; in particular PhtA, PhtB, PhtD, or PhtE), Lyt family (in particular LytA, LytB, or LytC), SpaA, Sp128, Sp130, Sp125, Sp101 and Sp133, or truncate or immunologically functional equivalent thereof.

For the purposes of this invention, "immunologically functional equivalent" is defined as a peptide of protein comprising at least one protective epitope from the proteins of the invention. Such epitopes are characteristically surface-exposed, highly conserved, and can elicit a bactericidal antibody response in a host or prevent toxic effects. Preferably, the functional equivalent has at least 15 and preferably 30 or more contiguous amino acids from the protein of the invention. Most preferably, fragments, deletions of the protein, such as transmembrane deletion variants thereof (ie the use of the extracellular domain of the proteins), fusions, chemically or genetically detoxified derivatives and the like can be used with the proviso that they are capable of raising substantially the same immune response as the native protein. The position of potential B-cell epitopes in a protein sequence may be readily determined by identifying peptides that are both surface-exposed and antigenic using a combination of two methods: 2D-structure prediction and antigenic index prediction. The 2D-

structure prediction can be made using the PSIPRED program (from David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). The antigenic index can be calculated on the basis of the method described by Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

5 The *Streptococcus pneumoniae* protein of the invention is preferably selected from the group consisting of: a protein from the polyhistidine triad family (Pht), a protein from the Lyt family, a choline binding protein, proteins having an LPXTG motif (where X is any amino acid), proteins having a Type II Signal sequence motif of LXXC (where X is any amino acid), and proteins having a Type I Signal sequence
10 motif. Preferred examples within these categories (or motifs) are the following proteins (or truncate or immunologically functional equivalent thereof):

 The Pht (Poly Histidine Triad) family comprises proteins PhtA, PhtB, PhtD, and PhtE. The family is characterised by a lipidation sequence, two domains separated by a proline-rich region and several histidine triads, possibly involved in
15 metal or nucleoside binding or enzymatic activity, (3-5) coiled-coil regions, a conserved N-terminus and a heterogeneous C terminus. It is present in all strains of pneumococci tested. Homologous proteins have also been found in other Streptococci and *Neisseria*. Preferred members of the family comprise PhtA, PhtB and PhtD. More preferably, it comprises PhtA or PhtD. It is understood, however, that the terms
20 Pht A, B, D, and E refer to proteins having sequences disclosed in the citations below as well as naturally-occurring (and man-made) variants thereof that have a sequence homology that is at least 90% identical to the referenced proteins. Preferably it is at least 95% identical and most preferably it is 97% identical.

 With regards to the Pht proteins, PhtA is disclosed in WO 98/18930, and is
25 also referred to Sp36. As noted above, it is a protein from the polyhistidine triad family and has the type II signal motif of LXXC.

 PhtD is disclosed in WO 00/37105, and is also referred to Sp036D. As noted above, it also is a protein from the polyhistidine triad family and has the type II LXXC signal motif.

30 PhtB is disclosed in WO 00/37105, and is also referred to Sp036B. Another member of the PhtB family is the C3-Degrading Polypeptide, as disclosed in WO 00/17370. This protein also is from the polyhistidine triad family and has the type II LXXC signal motif. A preferred immunologically functional equivalent is the protein

Sp42 disclosed in WO 98/18930. A PhtB truncate (approximately 79kD) is disclosed in WO99/15675 which is also considered a member of the PhtX family.

PhtB is disclosed in WO00/30299 and is referred to as BVH-3.

SpaA is a Choline binding protein (Cbp) disclosed in WO 98/39450.

5 The Lyt family is membrane associated proteins associated with cell lysis. The N-terminal domain comprises choline binding domain(s), however the Lyt family does not have all the features found in the choline binding protein family (Cbp) family noted below and thus for the present invention, the Lyt family is considered distinct from the Cbp family. In contrast with the Cbp family, the C-terminal domain contains
10 the catalytic domain of the Lyt protein family. The family comprises LytA, B and C. With regards to the Lyt family, LytA is disclosed in Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB is disclosed in WO 98/18930, and is also referred to as Sp46. LytC is also disclosed in WO 98/18930, and is also referred to as Sp91. A preferred member of that family is LytC.

15 Another preferred embodiment are Lyt family truncates wherein "Lyt" is defined above and "truncates" refers to proteins lacking 50% or more of the Choline binding region. Preferably such proteins lack the entire choline binding region.

 Sp125 is an example of a pneumococcal surface protein with the Cell Wall Anchored motif of LPXTG (where X is any amino acid). Any protein within this class
20 of pneumococcal surface protein with this motif has been found to be useful within the context of this invention, and is therefore considered a further protein of the invention. Sp125 itself is disclosed in WO 98/18930, and is also known as ZmpB - a zinc metalloproteinase.

 Sp101 is disclosed in WO 98/06734 (where it has the reference # y85993. It is
25 characterised by a Type I signal sequence.

 Sp133 is disclosed in WO 98/06734 (where it has the reference # y85992. It is also characterised by a Type I signal sequence.

 Sp128 and Sp130 are disclosed in WO 00/76540.

 The proteins used in the present invention are preferably selected from the
30 group PhtD and PhtA, or a combination of both of these proteins, or a combination or either or both with CbpA.

Further Aspects of the Invention

Further aspects of the invention provide: a method of manufacturing the multivalent meningococcal bleb composition or the vaccine of the invention comprising the step of combining a bleb with homologous bactericidal activity with a
5 bleb with heterologous bactericidal activity; a method of preventing or treating neisserial, preferably meningococcal, disease comprising the step of administering an immunologically effective amount of the vaccine of the invention (usually with a 3 dose primary immunisation scheme, preferably where each immunisation is separated by 1-2 months, and optionally boosted) to a host in need thereof (preferably a 2-4 year
10 old or adolescent human, and advantageously for an infant of less than two [preferably one] years); and the use of an immunologically effective amount of the vaccine of the invention in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of neisserial, preferably meningococcal, disease (particularly where the prevention of treatment is via a a 3 dose primary immunisation scheme [preferably where each
15 immunisation is separated by 1-2 months, and optionally boosted] and/or the prevention or treatment of disease is in a human - preferably a 2-4 year old or adolescent, and advantageously an infant of less than two [preferably one] years).

EXAMPLES

The examples below are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail.

5 The examples are illustrative, but do not limit the invention.

Example 1: Construction of a *Neisseria meningitidis* serogroup B strain lacking the major immunodominant antigen PorA.

10 This is described in Example 3 of WO 01/09350.

Example 2: Benefits of the Multivalent meningococcal bleb vaccines of the invention

A number of efficacy trials have been performed with serogroup B OMV
 15 vaccines. Two specific OMV vaccines were developed to combat epidemic situations in Cuba and Norway due mostly to single serosubtypes, i.e. 4:P1.15 and 15:P1.16, respectively. Both efficacy trials have been performed in teenagers in a placebo-controlled double-blind fashion. In Cuba an efficacy of 83% (confidence limits: 42%-95%) was found with a follow-up time of 16 months (Sierra NIPH Annals 1991,
 20 14:195-207) whilst in Norway an efficacy of 57% was found with a follow-up time of 29 months (lower confidence limit: 27%) (Bjune et al. NIPH Annals 1991 14:81-93). In Norway the efficacy was 86% at a follow-up time of 10 months, and a later third dose demonstrated enhanced immunogenicity and improved antibody persistence (Rosenquist, Infect. Immun. 1995 63:4642-4652). Since both trials were performed
 25 in a mostly type-homologous setting, no conclusions could be made about cross-protection.

When compared to the Norwegian vaccine in two head-to-head trials and using cross-bactericidal activity against the respective strains, the Cuban vaccine appears to induce a higher level of cross-bactericidal activity (see Table I).

30

Table 1: Serum Bactericidal Activity (SBA) induced by the Finlay meningococcal BC vaccine - % of SBA responders (Post dose 3)

Icelandic trial (Perkins et al, JID, 177, 1998, 683-691)					
	Age	N	15 : P1.16 (Norwegian strain)	4:P1.15 (Cuban strain)	4:P1.4 (NZ type)
Finlay	16-19 yrs	74	48	44	36
NIPH		75	84	31	27
Chilean trial (Tappeero, JAMA, 281, 1999, 1528-27)					
			15 : P1.16	4:P1.15	
Finlay	<1 yr	51	31	90	
	2-4 yrs	48	41	78	
	17-30 yrs	53	56	67	
NIPH	<1 yr	50	98	2	
	2-4 yrs	51	98	24	
	17-30 yrs	50	96	46	

An SBA responder was defined as a person with a 4-fold or greater rise in SBA titre compared with pre-vaccination titre.

Infants and children were given three doses of Finlay or control (Hib) vaccine two months apart.

In adults, the two first doses were given 2 months apart. The 3rd dose was given 2 months after the 2nd dose in the Chilean study and one year after the 2nd dose in the Icelandic trial.

Blood samples were taken prior to vaccination and 4-6 weeks after the second and third vaccination.

- 5 The present inventors have determined that when comparing bactericidal activity, the Norwegian vaccine leads to a more strain-specific response, whilst the Cuban vaccine induces more cross-bactericidal activity. Furthermore, the present inventors believe the Cuban bleb vaccine has such an activity because it is deficient in an immunodominant OMP, in particular PorA. Although deficient in PorA, sufficient
- 10 is present for homologous bactericidal activity to be also demonstrated with the Cuban vaccine.

 The present inventors have found that a multivalent vaccine comprising a bleb with homologous bactericidal activity (having a serosubtype prevalent in the country of use) and a bleb with heterologous bactericidal activity provides an optimal vaccine

15 which protects against locally prevalent epidemic strains, yet also provides heterologous protection which lowers the chance of the emergence of new serogroup B strains that could occur after implementation of a national mass immunisation campaign when the epidemic strain will decrease in prevalence.

 An optimal vaccine for Europe and/or New Zealand will incorporate a

20 combination of two separate blebs: P1.4 (epidemic strain) and P1.15 (with heterologous bactericidal activity - for instance OMV derived from strain CU-385 used to prepare the commercialised Cuban VA-MENGOC-BC[®] vaccine). This

combination aims to provide homologous P1.4 protection as well retaining the heterologous protection of the Cuban P1.15 strain.

Example 3: Multivalent Bleb Vaccine comprising blebs derived from meningococcal strain CU-385 (B:4:P1.19.15), and New Zealand epidemic meningococcal strain (B:4:P1.7b.4)

The above multivalent vaccine was made (25 µg of each bleb in each human dose, adjuvanted with aluminium hydroxide).

10 The monovalent and bivalent bleb preparations were tested to examine whether any immune interference resulted in combining the blebs together.

The level of induced functional antibodies was evaluated by a bactericidal test performed in mice with pooled serum samples.

15 Briefly, groups of 10 BALB/c mice (6-8 weeks old) were injected twice with the equivalent of 10 µg of protein of the adsorbed monovalent or bivalent bulks on day 0 and day 21. Blood samples were taken on day 35. Determination of the bactericidal activity in the sera was based on the property of the antibodies to induce bacterial lysis by complement activation. After incubating the sera with viable meningococcus B (both the CU-385 and P1.4 New Zealand strains were tested), in the presence of rabbit complement, the number of colony forming units (CFU) in the serum samples was determined. The Bactericidal titre is the latest serum dilution that gives more than 50% of killing.

20 Based on the results, the bivalent vaccine is immunogenic and induces functional antibodies. There was no indication of immune interference when the two monobulks were mixed.

Example 4: Relative PorA expression level in *N. meningitidis* strains.

30 Outer-membrane vesicle samples (made essentially as described in NIPH Annals 1991 14:67-80) from strains CU385, H44/76 and N150/88 were compared by SDS-PAGE for PorA expression level. Samples were run on Novex 4-20% gels. In Figure 1, 10 and 20 µg (Lowry determination) of materials were loaded per well, while in Figure 2, 10 µg of materials were loaded in duplicates for each strain. After

Coomassie Blue staining, 3 major bands were detected in the 3 strains: PorA (about 38KDa) PorB (about 36 Kda) and RMP (about 33 Kda). The detected bands on lanes loaded with 10 µg of material were scanned with two different densitometers: Pharmacia Imagescanner densitometer, using 1D-Elite software, and Biorad
5 densitometer, using MultiAnalist software. DO values were computed in order to determine the relative expression level of PorA for each strain. For each lane, the PorA level was expressed in % of the total of protein detected.

The results (table 1 below) show that the relative level of expression of PorA is lower in CU385 compared to the 2 other strains: PorA accounted for only about
10 20% of the total detected proteins in CU385 blebs, while it measured around 40 and 30% of protein in blebs from strains N150/88 and H44/76, respectively.

Table 1

Relative intensity of PorA, PorB and RMP in SDS-PAGE for different strains of MenB												
		Multi-Analyst				1D-Ellie						
		Fig 1	Fig 2 (n 1)	Fig 2 (n 2)	Mean %	Fig 1	Fig 2 (n 1)	Fig 2 (n 2)	Mean %			
N160/88	PorA	41.24	41.55	41.73	42	37.58	35.42	35.33	36			39
	PorB	22.48	23.97	24.03	23	23.28	21.98	22.55	23			23
	RMP	12.80	10.80	11.01	11	9.25	9.91	9.97	10			11
	Other	23.98	23.58	23.23	24	29.88	32.70	32.16	32			28
					100				100			100
CUS85	PorA	22.22	20.58	20.21	21	23.98	20.18	19.71	21			21
	PorB	43.74	45.08	45.95	45	48.37	43.97	43.05	44			45
	RMP	16.62	17.58	17.73	18	13.02	14.38	14.12	14			16
	Other	15.45	18.77	16.12	16	18.63	21.48	23.12	20			18
					100				100			100
H44/76 1706	PorA	29.78	30.25	29.8	30	29.78	27.92	28.31	29			29
	PorB	39.85	41.43	41.1	41	42.73	42.34	42.28	42			42
	RMP	18.87	15.88	14.88	16	16.42	15.45	16.28	15			16
	Other	13.93	12.58	14.24	14	12.11	14.3	14.11	14			14
					100				100			100

25

We Claim:

1. A multivalent meningococcal bleb composition comprising at least one bleb
5 with homologous bactericidal activity which is derived from a meningococcal strain with a serosubtype that is prevalent in a country of use, and at least one bleb with heterologous bactericidal activity which is derived from a meningococcal strain which need not have a serosubtype that is prevalent in the country of use.
- 10 2. The multivalent meningococcal bleb composition of claim 1 wherein the bleb with heterologous bactericidal activity is deficient in an immunodominant outer membrane protein compared to blebs derived from wild-type strain H44/76, and the bleb with homologous bactericidal activity is not deficient in said immunodominant outer membrane protein compared to blebs derived from wild-type strain H44/76.
15
3. The multivalent meningococcal bleb composition of claim 2 wherein the bleb with heterologous bactericidal activity is derived from a wild-type meningococcal strain that is naturally deficient in said immunodominant outer membrane protein.
- 20 4. The multivalent meningococcal bleb composition of claim 2 wherein the bleb with heterologous bactericidal activity is derived from a genetically-engineered meningococcal strain that produces less or none of said immunodominant outer membrane protein compared to the wild-type strain.
- 25 5. The multivalent meningococcal bleb composition of claim 4 wherein said genetically-engineered meningococcal strain has been genetically altered in either the promoter or coding region of the gene encoding the immunodominant outer membrane protein such that the strain produces less or none of said immunodominant outer membrane protein.
30
6. The multivalent meningococcal bleb composition of claims 2-5 wherein the immunodominant outer membrane protein is PorA.

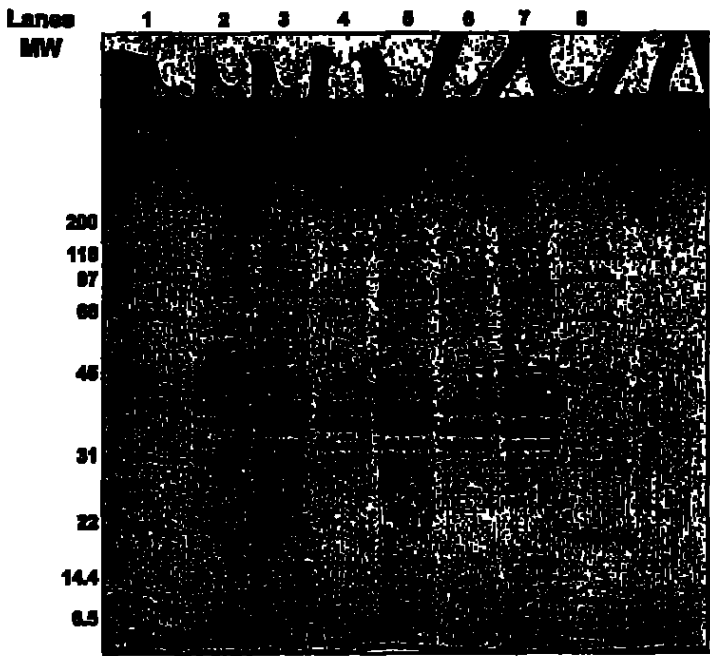
7. The multivalent meningococcal bleb composition of claim 2 or 3 wherein the immunodominant outer membrane protein is PorA, and the bleb with heterologous bactericidal activity is derived from meningococcal strain CU-385 (B:4:P1.19,15).
- 5 8. A multivalent meningococcal bleb composition comprising a bleb preparation deficient in PorA compared to blebs made from strain H44/76 and a bleb preparation that is not deficient in PorA compared to blebs made from strain H44/76.
9. The multivalent meningococcal bleb composition of claim 8, wherein the bleb
10 preparation deficient in PorA has less than 22% PorA of total bleb protein.
10. The multivalent meningococcal bleb composition of claim 8 or 9, wherein the bleb preparation not deficient in PorA has more than 28% PorA of total bleb protein.
- 15 11. The multivalent meningococcal bleb composition of claims 8-10, wherein the bleb preparation deficient in PorA is derived from the meningococcal CU-385 strain.
12. A vaccine for the treatment of neisserial, preferably meningococcal, disease comprising the multivalent meningococcal bleb composition of claims 1-11, and a
20 pharmaceutically acceptable excipient.
13. The vaccine of claim 12 additionally comprising one or more plain or conjugated meningococcal capsular polysaccharides selected from the following list of serotypes: A, C, Y and W.
25
14. The vaccine of claim 12 or 13 suitable for use in New Zealand or Europe wherein the bleb with homologous bactericidal activity or the bleb preparation that is not deficient in PorA is derived from a meningococcal strain with a serosubtype of P1.4.
30
15. The vaccine of claim 12 or 13 suitable for use in USA where the bleb with homologous bactericidal activity or the bleb preparation that is not deficient in PorA is derived from a meningococcal strain with a serosubtype of P1.7,16, and which

optionally comprises further blebs with homologous bactericidal activity derived from one or more meningococcal strains with serosubtypes selected from the following list: P1.7,1 ; P1.5,2 ; P1.22a,14 ; and P1.14.

- 5 16. The vaccine of claim 12 or 13 suitable for use in Norway wherein the bleb with homologous bactericidal activity or the bleb preparation that is not deficient in PorA is derived from a meningococcal strain with a serosubtype of P1.16.
- 10 17. A method of manufacturing the multivalent meningococcal bleb composition of claims 1-11 or the vaccine of claims 12-16 comprising the step of combining the bleb with homologous bactericidal activity with the bleb with heterologous bactericidal activity, or the step of combining the bleb preparation that is not deficient in PorA with the bleb preparation that is deficient in PorA.
- 15 18. A method of preventing or treating neisserial, preferably meningococcal, disease comprising the step of administering an immunologically effective amount of the vaccine of claims 12-16 to a host in need thereof.
- 20 19. The use of an immunologically effective amount of the vaccine of claims 12-16 in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of neisserial, preferably meningococcal, disease.

Figure 1

Novex 4-20% 10wells 1mm	Cat n°EC8028
Coomassie G250	Gel type: reducing (EtOH)
Gel n° 3030	Gel code: 2071541-363



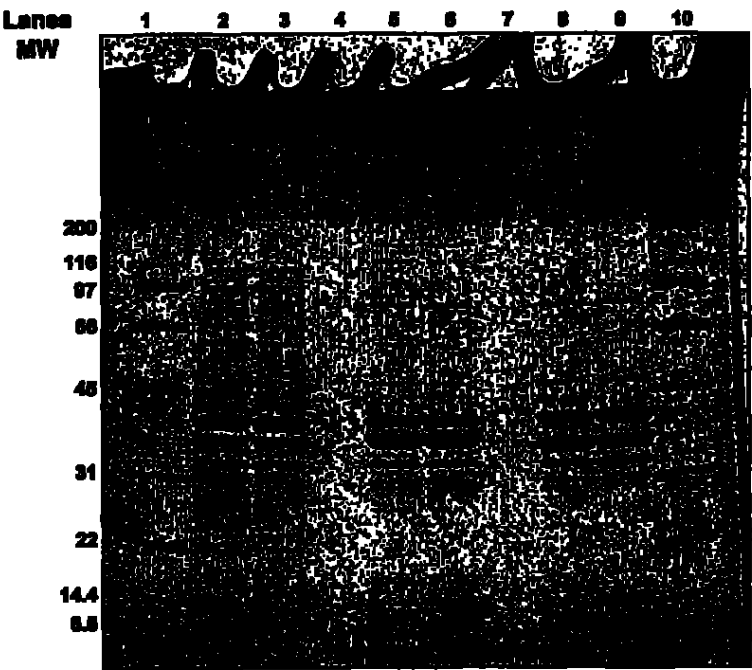
Lane definitions

n°	Samples	µg dép
1	Std BIORAD Broad (200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6.5 kDa)	5µl
2	N150/88	10
3	N150/88	20
4	CU385	10
5	CU385	20
6	H44/78 1708	10
7	H44/78 1708	20
8	Std BIORAD Broad (200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6.5 kDa)	5µl

2/2

Figure 2

Novex 4-20% 10wells 1mm	Cat n°EC0025
Coomassie G250	Gel type: reducing (EtSH)
Gel n° 3038	Gel code: 2071240-1208



Lane definitions

n°	Samples	µg dép
1	Std BIORAD Broad (200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6.5 kDa)	5µl
2	N150/88	10
3	N150/88	10
4	SB1x	
5	CU385	10
6	CU385	10
7	SB1x	
7	H44/76 1708	10
8	H44/76 1708	10
9	Std BIORAD Broad (200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6.5 kDa)	5µl

COMPOSICIÓN VACUNAL

MEMORIA DESCRIPTIVA

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de los compuestos vacunales de *Neisseria*; su producción y uso en la medicina. Se relaciona más específicamente con el campo de las novedosas vacunas antimeningocócicas multivalentes de vesículas de membrana externa y de métodos ventajosos para que las mismas sean más efectivas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Neisseria meningitidis (meningococo) es una bacteria Gram-negativa que se aísla frecuentemente del tracto superior respiratorio de los humanos. En ocasiones provoca enfermedades bacterianas invasivas como bacteriemia y meningitis. La incidencia de la enfermedad meningocócica muestra diferencias con respecto a las zonas geográficas, estaciones y temporada del año (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). La mayor incidencia de la enfermedad en los países con climas templados se debe a las cepas del serogrupo B y varía desde 1-10/100,000/población total año, alcanzando en ocasiones valores superiores (Kaczmarek, E.B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. et al. Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., et al. Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990). Las incidencias específicas de la edad en los dos grupos de alto riesgo, infantes y adolescentes, alcanzan niveles superiores.

Las epidemias dominadas por los meningococos del serogrupo A, mayormente en Africa central, algunas veces alcanzan niveles de hasta 1000/100,000/año (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). Casi todos los casos de enfermedad meningocócica en su conjunto son provocados por los meningococos de los serogrupos A, B, C, W-135 y Y. Se encuentra disponible una vacuna tetravalente (A, C, W-135, Y) de polisacárido capsular (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982).

En la actualidad se están mejorando las vacunas de polisacáridos conjugándolas químicamente con proteínas portadoras (Lieberman, J.M., Chiu, S.S.,

Wong, V.K., et al. JAMA 275 : 1499-1503, 1996). No se cuenta con una vacuna del serogrupo B ya que el polisacárido capsular B no es inmunógeno. Esto se debe fundamentalmente a que éste comparte una similitud estructural con los componentes hospederos (Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L. et al. J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Mäkelä, P.M. Lancet ii.: 355-357, 1983).

Es por eso que durante años los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de vacunas basadas en vesículas de membrana externa del meningococo (de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C. et al. Lancet 340: 1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E.A. Gronnesby, J.K. et al. 338: 1093-1096, 1991). Estas vacunas tienen la ventaja de incluir algunas proteínas integrales de membrana externa con una adecuada conformación que permite inducir una respuesta inmunológica protectora cuando se administra a un hospedero. Además, las cepas de *Neisseria* (incluyendo *N. meningitidis* serogrupo B – menB) excretan vesículas de membrana externa en cantidades suficientes que permiten su producción a escala industrial. De manera alternativa, las vesículas pueden prepararse mediante métodos conocidos que comprenden la extracción con detergente de las células bacterianas (EP 11243), cuyo beneficio es eliminar algunas endotoxinas (lipo-polisacáridos o LPS) de la vacuna.

Estas vacunas multicompuestas de proteína de membrana externa, que se derivan de las cepas menB tipo salvaje, han mostrado eficacias desde 57% - 85% en niños mayores (>4 años) y adolescentes y han sido registradas en América Latina. La mayoría de estos ensayos de eficacia se realizaron con VME (vesículas de membrana externa) de menB a través de un proceso de extracción con detergente.

Muchos componentes bacterianos de membrana externa están presentes en estas vacunas, tales como PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB y su contribución a la protección observada aún requiere más definición. Se ha definido también que otros componentes bacterianos de membrana externa (utilizando anticuerpos de animales o humanos) exhiben relevancia potencial en la inducción de inmunidad protectora, tales como TbpB, NspA (Martin, D., Cadieux, N., Hamel, J., Brodeux, B.R., J. Exp. Med. 185: 1173-1183, 1997; Lissolo, L., Maître-Wilmotte, C., Dumas, p. et al., Inf. Immun. 63: 884-890, 1995). El mecanismo de esta inmunidad supondrá la actividad bactericida mediada por los anticuerpos y la opsonofagocitosis

En muchos países europeos, la frecuencia de las infecciones por *Neisseria meningitidis* ha aumentado en las últimas décadas. Esto es atribuible a la creciente

particularmente si 2, 3 ó 4 preparados de vesículas con actividad bactericida homóloga se incorporan en la vacuna) en términos de porcentaje entre las cepas de todos los serosubtipos causantes de la enfermedad meningocócica en el país (región o continente) – es decir, cepas aisladas durante vigilancia activa en laboratorios de la enfermedad meningocócica en un país, región o continente. Preferiblemente el serosubtipo de esa vesícula constituye más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ó 60 % de todos los serosubtipos causantes de la enfermedad meningocócica en el país (región o continente).

Si un preparado de vesículas con actividad bactericida homóloga se incluye en un compuesto, es preferible que se derive de una cepa con un subserotipo de mayor prevalencia en el país (región o continente); si se incluyen dos, tres o cuatro, entonces es preferible que las cepas utilizadas cubran los dos, tres o cuatro (respectivamente) subserotipos de mayor prevalencia.

"Cepa meningocócica que no necesita tener un serosubtipo que prevalezca en el país de uso" quiere decir que la vesícula puede derivarse (pero no necesariamente) de una cepa meningocócica que no proviene del serosubtipo de mayor prevalencia (o es segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto) en términos de porcentaje entre las cepas de todos los serosubtipos causantes de la enfermedad meningocócica en el país (región o continente) – es decir, cepas aisladas durante vigilancia activa en laboratorios de casos esporádicos de enfermedad meningocócica en un país, región o continente. En ese caso, es preferible que el serosubtipo de esa vesícula constituya menos del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ó 60 % de todos los serosubtipos causantes de la enfermedad meningocócica en el país (región o continente).

"Derivada de una cepa meningocócica" quiere decir que la vesícula se aísla de la cepa meningocócica utilizando cualquier método conocido – como es el aislamiento libre de detergente, o procesos que requieren detergente (como el deoxicolato) en el aislamiento.

Preparados de vesículas que poseen "actividad bactericida homóloga" o "actividad bactericida heteróloga" quiere decir que los preparados de vesículas inducen actividades bactericidas de suero (ABS) satisfactorias al administrarse a un hospedero contra cepas meningocócicas homólogas o heterólogas, respectivamente.

La ABS es el marcador inmunológico acordado mayoritariamente para estimar la eficacia de una vacuna antimeningocócica (Perkins et al. J Infect Dis. 1998, 177:683-691). Una ABS satisfactoria se puede determinar mediante cualquier

método conocido. Preferiblemente se toma una muestra de sangre antes de la primera vacunación, dos meses después de la segunda y un mes después de la tercera. (tres vacunaciones en un año se considera un típico esquema de vacunación primaria en humanos administradas, por ejemplo, a los 0, 2 y 4 meses, ó 0, 1 y 6 meses). Estos esquemas de vacunación primaria en humanos se pueden realizar en infantes menores de un año (por ejemplo, al mismo tiempo que se realizan las vacunaciones con Hib) ó de 2-4 años de edad; los adolescentes también pueden ser vacunados para evaluar la ABS con ese esquema de vacunación primaria. Se puede tomar otra muestra de sangre 6 a 12 meses después de la vacunación primaria y un mes después de una dosis booster, si es aplicable.

La ABS será satisfactoria para un preparado de vesículas con actividad bactericida homóloga si un mes después de la tercera dosis de la vacuna (del esquema de vacunación primaria) (en niños de 2-4 años o adolescentes, pero preferiblemente en infantes en el primer año de vida), el porcentaje de sujetos con un incremento de cuatro veces en términos del título ABS (dilución de anticuerpo) (comparado con el título previo a la vacunación) contra la cepa meningocócica a partir de la cual se deriva la vesícula es mayor del 30%, preferiblemente mayor del 40%, mejor si es mayor del 50%, y aún mejor si es mayor del 60% de los sujetos.

Por supuesto, un preparado de vesícula con actividad bactericida heteróloga también puede ser un preparado con actividad bactericida heteróloga si también puede inducir una ABS satisfactoria contra la cepa meningocócica de la cual se deriva.

La ABS será satisfactoria para un preparado de vesículas con actividad bactericida heteróloga si un mes después de la tercera dosis de la vacuna (del esquema de vacunación primaria) (en niños de 2-4 años o adolescentes, pero preferiblemente en infantes en el primer año de vida), el porcentaje de sujetos con un incremento de cuatro veces en términos del título ABS (dilución de anticuerpo) (comparado con el título previo a la vacunación) contra tres cepas heterólogas de meningococo es mayor del 20%, preferiblemente mayor del 30%, mejor si es mayor del 35%, y aún mejor si es mayor del 40% de los sujetos. Esta prueba es un buen indicador de si el preparado de vesícula con actividad bactericida heteróloga puede inducir anticuerpos bactericidas cruzados contra varias cepas meningocócicas. Las tres cepas heterólogas deben tener preferiblemente diferente complejo de tipo electroforético (ET por sus siglas en inglés) – o patrón de secuencia multilocus (MLST por sus siglas en inglés) (ver Maiden et al. PNAS USA 1998, 95:3140-5) diferentes entre sí y preferiblemente a la cepa a partir de la cual se elabora el preparado de

vesículas con actividad bactericida heteróloga. Una persona calificada podrá fácilmente determinar tres cepas con diferente complejo ET, lo que refleja la diversidad genética observada entre los meningococos, particularmente entre las cepas de meningococos tipo B que se reconoce son la causa de la carga significativa de la enfermedad y/o representa reconocidas líneas MenB hiper-virulentas (ver Maiden et al. *supra*). Por ejemplo, tres cepas que pudieran utilizarse son las siguientes: BZ10 (B:2b:P1.2) pertenecientes al cluster A-4; B16B6 (B:2a:P1.2) perteneciente al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7,16) perteneciente al complejo ET-5, o cualquier otra cepa perteneciente al mismo ET/Cluster. Estas cepas pueden utilizarse para evaluar un preparado de vesículas con actividad bactericida heteróloga elaborado a partir de, por ejemplo, la cepa meningocócica CU385 (B:4:P1.15) que pertenece al complejo ET-5. Otra muestra de cepa que pudiera utilizarse es a partir del clon epidémico Línea 3 (ej., NZ124 [B:4:P1.7,4]). Otra cepa del ET-37 es NGP165 (B:2a:P1.2).

En este campo se conocen los procesos para medir la ABS. Por ejemplo, un método que pudiera utilizarse es el descrito en WO 99/09176 en el Ejemplo 10C. En términos generales, se siembra un cultivo de la cepa a evaluar (preferiblemente en condiciones de reducción del hierro – por adición de un quelador del hierro como EDDA al medio de crecimiento) en la fase log del crecimiento. Este puede ser suspendido en un medio con ASB (Albúmina Sérica Bovina) (como el medio Hanks con 0.3% de ASB) para obtener una suspensión celular de trabajo ajustada a aproximadamente 20000 UFC/ml. Se puede hacer una serie de mezclas de reacción uniendo una serie de diluciones dobles de sueros a evaluar (preferiblemente inactivadas por calor a 56°C durante 30 min) [por ejemplo en un volumen de 50µl/pocillo] y la suspensión de cepa meningocócica 20000 UFC/ml a evaluar [por ejemplo en un volumen de 25µl/pocillo]. Los viales de reacción deben incubarse (37°C durante 15 minutos) y agitarse (a 210 rpm). La mezcla de reacción final (por ejemplo en un volumen de 100µl] contiene además una fuente de complemento [25 % del volumen final de suero de conejo (gazapos) pre-evaluado]], y también se incuba [37°C durante 60 min]. Para este ensayo se puede utilizar una placa estéril de poliestireno para microtitulación, con un fondo en forma de U y compuesta por 96 pocillos. Se puede extraer un alícuota [10 µl] de cada pocillo utilizando una pipeta multicanal. El mismo se vierte en placas agar Mueller-Hinton (que contienen preferiblemente Isovitalex al 1 % y Suero de Caballo al 1 % inactivado por calor) e incubado (por ejemplo durante 18 horas a 37°C en CO₂ al 5 %). Preferiblemente, las colonias individuales se pueden contar hasta 80 UFC por alícuota. Las siguientes tres muestras

de ensayo se pueden utilizar como controles: buffer + bacteria + complemento; buffer + bacteria + complemento inactivado; suero + bacteria + complemento inactivado. Los títulos de ABS se pueden calcular fácilmente utilizando un programa que procesa los datos para proporcionar una medición de la dilución que corresponde al 50 % de las células muertas mediante cálculo de regresión.

En otro aspecto de la invención, los presentes innovadores han encontrado que el preparado de vesículas con actividad bactericida heteróloga de la invención puede lograr sus propiedades bactericidas cruzadas al ser deficientes en proteínas de membrana externa (PME) inmunodominantes comparado con preparados normales de vesículas de tipo salvaje.

Así, la presente invención también ofrece un compuesto de vesículas meningocócicas multivalente donde la vesícula con actividad bactericida heteróloga es deficiente en una proteína de membrana externa inmunodominante comparada con las vesículas derivadas de una cepa de comparación (por ejemplo la de tipo salvaje MC58, pero preferiblemente la cepa de tipo salvaje H44/76), y la cepa con actividad bactericida homóloga no es deficiente en dicha proteína de membrana externa inmunodominante comparada con las vesículas derivadas de la misma cepa de comparación.

Una persona calificada entenderá fácilmente que es una PME inmunodominante, pero es preferible que la PME inmunodominante de la invención tenga epítopes altamente inmunógenos, expuestos a la superficie (preferiblemente dentro de las secuencias con estructura de lazo expuestas a la superficie) y que sea una de las 10 primeras PME altamente expresadas (ya sea por peso o por No. de moléculas por célula) sobre la superficie meningocócica. Usualmente estas PME son altamente inmunógenas pero son bastante variables en la secuencia de amino ácidos de sus estructuras en forma de lazo de cepa a cepa.

"Deficiente" quiere decir que el preparado de vesícula con actividad bactericida heteróloga de la invención posee menos PME inmunodominante de la invención sobre su superficie que las vesículas elaboradas a partir de la cepa de comparación. En particular, el preparado de vesícula con actividad bactericida heteróloga debe tener menos de 98, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, ó 5% de la cantidad de PME inmunodominante comparado con una cantidad similar de vesículas preparadas a partir de la cepa de comparación. Mayormente, es preferible que el preparado de vesícula con actividad bactericida heteróloga de la invención no deba poseer ninguna de la PME inmunodominante. Lo anterior es también la definición de "deficiente" donde

este documento compara el nivel de PME inmunodominante sobre la cepa de producción de vesículas con respecto a la cepa de comparación. Una cepa o vesícula también pueden ser deficientes en la PME inmunodominante si la PME está preparada para no estar expuesta a la superficie en la membrana externa de la vesícula/cepa, o si la PME está expresada en el mismo nivel pero uno o más lazos (loops) expuestos a la superficie están preparados para ser menos variables o inmunodominantes por sustitución, mutación o eliminación para proporcionar vesículas elaboradas a partir de esa cepa con mayor actividad bactericida heteróloga.

Preferiblemente el proceso de derivación del preparado de vesícula con actividad bactericida heteróloga a partir de la cepa meningocócica fuente es el mismo que se utiliza para derivar las vesículas de la cepa de comparación. Sin embargo, este no necesariamente es el caso, particularmente si la razón del preparado de vesícula con actividad bactericida heteróloga deficiente en la PME inmunodominante es la forma en que se producen las vesículas. En ese caso, el procedimiento estándar para la producción de vesículas para la cepa de comparación es el método descrito por Frederiksen et al. (NIPH Annals. 1991, 14:67-80) o Bjune et al. (NIPH Annals 1991 14:81-93).

La vesícula con actividad bactericida heteróloga se puede derivar de una cepa meningocócica de tipo salvaje que por naturaleza es deficiente en la proteína de membrana externa inmunodominante, o puede derivarse de las cepas meningocócicas que se vuelven deficientes en la proteína de membrana externa inmunodominante.

En particular, la vesícula con actividad bactericida heteróloga se puede volver deficiente en la PME inmunodominante haciendo que la cepa de producción sea deficiente en la PME mediante ingeniería genética o que produzca menos o ninguna de las PME comparada con la cepa de tipo salvaje a partir de la cual es producida.

Por "menos o ninguna" se entiende en particular que la cepa expresa menos del 98, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, ó 5% de la cantidad de PME inmunodominante sobre superficie comparada con la cepa de tipo salvaje a partir de la cual es producida. Más bien la cepa producida no expresa ninguna de las PME inmunodominante. Una cepa puede tener también menos o ninguna PME inmunodominante si la PME se produce de manera tal que no se encuentre expuesta en la superficie de la membrana externa de la cepa, o si la PME está expresada en el mismo nivel pero uno o más lazos expuestos a la superficie están producidos de manera que sean menos variables o inmunodominantes por su sustitución, mutación o

eliminación para proporcionar vesículas, a partir de esa cepa, con mayor actividad bactericida heteróloga.

El gen que codifica la PME inmunodominante de la invención se puede producir según el método arriba mencionado mediante técnicas conocidas. En particular, la cepa meningocócica se puede alterar genéticamente en la región promotora o de código del gen para que la cepa produzca menos o ninguna de dicha PME inmunodominante. Las formas particulares mediante las cuales se puede lograr esto aparecen descritas en WO 01/09350. Por ejemplo, un transposón (gen móvil, gen que salta) (u otra secuencia) puede insertarse para romper la región promotora o de código del gen; las mutaciones o eliminaciones pueden lograr un similar resultado. La región promotora o codificadora puede ser eliminada completa o parcialmente para hacer que el producto del gen sea menos inmunodominante (mediante sustitución, mutación o eliminación de los epítopes inmunógenos presentes en los lazos expuestos en la superficie) Se pueden utilizar eventos recombinantes para eliminar, insertar, sustituir o mutar secuencias en la PME para volverlas menos inmunodominantes, tales como la sustitución de un promotor fuerte por uno débil (o no). Las mutaciones del marco de lectura (frameshift) también se pueden insertar dentro de la región codificadora.

Sin comprometernos con la teoría, se piensa que la combinación de una vesícula así con una que presenta actividad bactericida homóloga es efectiva como vacuna, ya que esta última es efectiva contra cepas prevalentes en un país de uso en virtud de los anticuerpos bactericidas que se son generados contra la PME inmunodominante (pero variable) de la invención; no obstante, debido a que la PME inmunodominante de la invención puede enmascarar inmunológicamente la eficacia de antígenos más conservados presentes en la superficie de la vesícula (presentes a niveles inferiores), la vesícula con actividad bactericida homóloga no posee actividad bactericida heteróloga satisfactoria, con las desventajas arriba mencionadas. El enmascaramiento de la vesícula con actividad bactericida heteróloga de la invención se ha eliminado en cierto grado para que las PME conservadas, presentes en bajos niveles en las vesículas, tengan mayor influencia sobre el sistema inmune del hospedero, y por tanto pueda inducir anticuerpos bactericidas cruzados en un hospedero con actividad bactericida heteróloga satisfactoria. La combinación de los dos tipos de vesículas ofrece un preparado que puede ser formulado en una vacuna de uso óptimo en una región o país particular.

Preferiblemente, la vesícula con actividad bactericida heteróloga es deficiente en (o ha sido producida para que tenga menos o ninguna) PME inmunodominante que

constituyen uno o más de los siguientes antígenos: PorA, PorB, OpC, OpA o PilC. Generalmente la vesícula es deficiente en (o ha sido producida para que tenga menos o ninguna) PorA.

Un preparado de vesícula preferido con actividad bactericida heteróloga de la invención que por naturaleza es deficiente en PorA es un preparado de vesícula aislado de la cepa meningocócica CU-385 (B:4:P1.19,15), preferiblemente aislado por el método que aparece en EP 301992-B. PorA es deficiente en esta cepa o vesícula comparado con la cepa o vesícula de comparación(ej. H44/76).

Además, la vesícula con actividad bactericida heteróloga de la invención puede mejorarse más en términos de sus propiedades bactericidas cruzadas (ABS satisfactoria). Esto se puede lograr mejorando la cantidad de ciertas PME sobre la superficie de dicha vesícula.

Por consiguiente, la vesícula con actividad bactericida heteróloga de la invención aquí descrita se deriva preferiblemente de una cepa meningocócica producida que posee expresión sobrerregulada de uno o más de los siguientes genes (ya sea añadiendo una copia extra del gen a la cepa o insertando una corriente promotora más fuerte del gen existente, o cualquier otra forma descrita en WO 01/09350): NspA (WO 96/29412), Hsf-like (WO 99/31132), Hap (PCT/EP99/02766), OMP85 (WO 00/23595), PilQ (PCT/EP99/03603), PldA (PCT/EP99/06718), FrpB (WO 96/31618), TbpA (US 5,912,336), TbpB, FrpA and/or FrpC (WO 92/01460), LbpA and/or LbpB (PCT/EP98/05117), FhaB (WO 98/02547), HasR (PCT/EP99/05989), lipo02 (PCT/EP99/08315), Tbp2 (WO 99/57280), MltA (WO 99/57280), y ctrA (PCT/EP00/00135).

"Expresión sobrerregulada" se refiere a cualquier forma de mejorar la expresión de un antígeno de interés, relacionado con la vesícula no modificada (es decir, que ocurre de forma natural). Se entiende que la cantidad de 'sobrerregulación' variará en dependencia del antígeno de interés pero no excederá una cantidad que romperá la integridad de la membrana de la vesícula. Sobrerregulación de un antígeno se refiere a una expresión que es por lo menos el 10% superior a la de la vesícula no modificada. Preferiblemente es por lo menos 50% mayor. Mejor será si es por lo menos el 100% mayor (2 veces).

Formulaciones de la vacuna

Una mejor expresión de la invención es la formulación de compuestos multivalentes de vesículas en una vacuna para el tratamiento o prevención de la

enfermedad (preferiblemente meningocócica) provocada por neisseria que puede también contener un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La producción de preparados de vesícula a partir de cualquiera de las cepas anteriormente citadas (a menos que se plantee de otra manera) puede lograrse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos por una persona calificada. Los métodos que con mayor preferencia se utilizan son los que aparecen en EP 301992, US 5,597,572, EP 11243 o US 4,271,147, Frederikson et al. (NIPH Annals [1991], 14:67-80), Zollinger et al. (J. Clin. Invest. [1979], 63:836-848), Saunders et al. (Infect. Immun. [1999], 67:113-119), Drabick et al. (Vaccine [2000], 18:160-172) o WO 01/09350 (Ejemplo 8). En general, las VME se extraen con un detergente, generalmente deoxicolato, y los ácidos nucleicos se eliminan opcionalmente mediante métodos enzimáticos. La purificación se logra por ultracentrifugación, seguida de manera opcional por cromatografía de exclusión de tamaño. Las dos o más vesículas diferentes de la invención pueden combinarse en un solo recipiente para formar un preparado multivalente de la invención (aunque un preparado también se considera multivalente si las vesículas diferentes de la invención son compuestos separados en recipientes separados que se administran al mismo tiempo [la misma visita a un practicante] a un hospedero). Los preparados de VME se esterilizan usualmente mediante filtración a través de un filtro de 0.2 um y preferiblemente se almacenan en una solución de sacarosa (3%) que se conoce estabilizan los preparados de vesículas.

El preparado vacunal se describe generalmente en el Diseño de la Vacuna ("El enfoque de sub-unidad y adyuvante" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York).

Los compuestos multivalentes de vesículas de la presente invención pueden ser adyuvadas en la formulación de la vacuna de invención. Los adyuvantes convenientes incluyen una sal de aluminio como el gel de hidróxido de aluminio (alum) o fosfato de aluminio (preferiblemente hidróxido de aluminio), pero puede ser también una sal de calcio (particularmente carbonato de calcio), hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acetiladas, o azúcares acetilados, polisacáridos derivados catiónicamente o aniónicamente, o polifosfatos.

Los adecuados sistemas adyuvantes Th1 que se pueden utilizar incluyen Monophosphoryl lipid A, particularmente 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (u otros derivados no tóxicos de LPS), y una combinación de monophosphoryl lipid A, preferiblemente 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL) [o derivados no

tóxicos de LPS] junto con una sal de aluminio. Un sistema mejorado es la combinación de un monophosphoryl lipid A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 [u otra saponina] y 3D-MPL [o derivado no tóxico de LPS] según aparece en WO 94/00153, o un compuesto menos reactogénico donde el QS21 [o saponina] es eliminado con colesterol según aparece en WO96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente compuesta por QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en WO95/17210 y es una formulación preferida.

La vacuna puede contener saponina, preferiblemente QS21. También puede contener una emulsión de aceite en agua y tocoferol. CpG no metilados que contienen oligonucleótidos (WO 96/02555) también se prefieren porque inducen una respuesta Th1 y su uso es adecuado en la presente invención.

El preparado vacunal de la presente invención se puede utilizar para proteger o tratar un mamífero susceptible a la infección mediante administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por administración mucosal a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genito-urinario. Así, uno de los aspectos de la presente invención es que constituye un método para la inmunización de un hospedero humano contra una enfermedad (preferiblemente meningocócica) causada por las bacterias de neisseria. Este método consiste en la administración a un hospedero de una dosis inmuno-protectora del preparado multivalente de vesículas de la presente invención.

La cantidad de vesículas de cada dosis de vacuna que se selecciona es aquella que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos adversos significativos que provocan las vacunas típicas. Esta cantidad variará en dependencia del inmunógeno específico empleado y cómo éste se presenta. Generalmente, se pretende que cada dosis tenga 1-100µg de cada vesícula, preferiblemente 5-50µg, y con mayor frecuencia en el rango de 5 - 25µg. Por tanto, para una vacuna bivalente de vesículas de la invención, cada dosis puede incluir típicamente 2 x 25µg de vesícula.

La cantidad óptima de cada vesícula en una vacuna particular se puede determinar mediante estudios estándar que comprenden la observación de respuestas inmunes adecuadas en sujetos. Siguiendo una vacunación inicial (primaria) (típicamente 3 administraciones, preferiblemente en el primer año de vida o en un solo año durante la adolescencia, por ejemplo a los 0, 2 y 4 meses, ó a los 0, 1 y 6 meses),

los sujetos pueden recibir una o algunas inmunizaciones booster (1 años después de la administración primaria) con los intervalos adecuados. La vacuna de la invención puede utilizarse para inmunizar a los bebés en el primer año de vida, 2-4 años, o adolescentes. Particularmente es ventajosa en la inducción de una actividad bactericida heteróloga satisfactoria en bebés durante el primer año de vida.

Vacunas de Células Enteras Inactivadas o Fantasma(Ghost)

Los innovadores consideran que el mejoramiento, arriba mencionado, de los preparados y vacunas multivalentes de vesículas se pueden extender fácilmente a los preparados y vacunas de células enteras inactivadas. (con idénticas ventajas). Las cepas meningocóccicas utilizadas para los preparados multivalentes de vesículas de la invención también se pueden utilizar para los preparados de células enteras inactivadas. Los métodos de producción de preparados fantasmas (células vacías con membranas externas intactas) a partir de cepas Gram-negativas son bien conocidos en este campo (ver WO 92/01791). También son bien conocidos los métodos para inactivar células enteras con el fin de utilizar preparados de células inactivadas en vacunas. Los términos 'preparados de vesículas' y 'vacunas de vesículas' así como los procesos descritos en este documento son por tanto aplicables a los términos 'preparación fantasma' y 'vacuna fantasma, y 'preparado de célula entera inactivada' y 'vacuna de célula entera inactivada', respectivamente, para los propósitos de esta invención.

Compuestos Vacunales Preferidos de la invención

La vacuna preferida de la invención según se describe arriba y cuyo uso es +particularmente conveniente en un programa de vacunación de Nueva Zelanda o Europa (preferiblemente la Unión Europea) posee un compuesto multivalente de vesícula de la invención donde la vesícula con actividad bactericida homóloga se deriva de una cepa meningocóccica con un serosubtipo de P1.4.

La vacuna preferida de la invención según se describe arriba y cuyo uso es particularmente conveniente en un programa de vacunación en Estados Unidos posee un compuesto multivalente de vesícula de la invención donde la vesícula con actividad bactericida homóloga se deriva de una cepa meningocóccica con un serosubtipo de P1.7, 16, y también se incluyen opcionalmente otras vesículas con actividad bactericida homóloga que se derivan de una o más cepas meningocóccicas con

serosubtipos seleccionados a partir de la siguiente lista: P1.7,1 ; P1.5,2 ; P1.22a,14 ; y P1.14.

5 La vacuna preferida de la invención según se describe arriba y cuyo uso es particularmente conveniente en un programa de vacunación en Noruega posee un compuesto multivalente de vesícula de la invención donde la vesícula con actividad bactericida homóloga se deriva de una cepa meningocócica con un serosubtipo de P1.16.

Combinaciones de Vacunas

10 Otro aspecto de la invención está relacionado con la combinaciones de vacunas que poseen los preparados o vacunas multivalentes de vesículas de la invención con otros antígenos utilizados ventajosamente contra ciertas enfermedades. Se ha encontrado que las vesículas son particularmente convenientes para la formulación con otros antígenos ya que por ventaja éstas tienen un efecto adyuvante sobre los
15 antígenos con los que son mezcladas.

En una combinación preferida, los preparados o vacunas multivalentes de vesículas meningocócicas de la invención se formulan con 1, 2, 3 o preferiblemente los 4 de los siguientes polisacáridos capsulares meningocócicos que pueden estar solos o conjugados con un portador que comprende epítopes de células-T
20 (preferiblemente un portador de proteína como el toxoide tetánico, toxoide diftérico o CRM197): A, C, Y o W. Con el término "polisacárido" se pretende abarcar los polisacáridos con forma o sin ella u oligosacáridos con forma . Se prefiere incluir por lo menos C y Y en una vacuna europea, por lo menos C se incluye en una vacuna estadounidense y por lo menos A y C se incluyen en un país africano, suramericano o ecuatoriano. Una vacuna de este tipo puede utilizarse ventajosamente como vacuna
25 antimeningocócica global.

En otra expresión preferida, los preparados o vacunas multivalentes de vesículas de la invención (preferiblemente formulados con 1, 2, 3 o los 4 polisacáridos capsulares meningocócicos, simples o conjugados A, C, Y o W) se formulan con un
30 polisacárido capsular conjugado *H. influenzae* b, y/o uno o más polisacáridos capsulares neumocócicos , simples o conjugados. Opcionalmente, la vacuna puede también contener uno o más antígenos de proteína que pueden proteger a un hospedero contra la infección por *Streptococcus pneumoniae*.. Una vacuna de este tipo puede utilizarse ventajosamente como vacuna antimeningocócica global. Los
35 antígenos de polisacárido capsular neumocócico son seleccionados preferiblemente a

partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (con mayor preferencia a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F).

Los antígenos de proteínas neumocócicas que se prefieren son aquellas proteínas neumocócicas expuestas en la superficie externa del neumococo (que pueden ser reconocidas por el sistema inmune del hospedero durante por lo menos parte del ciclo de vida del neumococo), o son proteínas secretadas o liberadas por el neumococo. Más bien, la proteína es una toxina, adhesin, transductor de señal de 2-componentes, o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o truncado o equivalente inmunológicamente funcional. Las proteínas que particularmente se prefieren incluyen pero no están limitadas a: neumolisina (preferiblemente destoxificada por tratamiento o mutación química) [Mitchell *et al.* *Acidos Nucleicos Res.* 1990 Jul 11; 18(13): 4010 "Comparación de genes de neumolisina y proteínas a partir de *Streptococcus pneumoniae* tipos 1 y 2.", Mitchell *et al.* *Biochim Biophys Acta* 1989 Jan 23; 1007(1): 67-72 "Expresión del gen de neumolisina en *Escherichia coli*: purificación rápida y propiedades biológicas", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton *et al.*), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de eliminación transmembrana (US 5804193 - Briles *et al.*); PspC y variantes de eliminación transmembrana (WO 97/09994 - Briles *et al.*); PsaA y variantes de eliminación transmembrana (Berry & Paton, *Infect Immun* 1996 Dec;64(12):5255-62 "Heterogeneidad de secuencia de PsaA, una adhesina putativa de 37-kilodalton esencial para la virulencia de *Streptococcus pneumoniae*"); proteínas de enlace con colina neumocócica y variantes de eliminación transmembrana; CbpA y variantes de eliminación transmembrana (WO 97/41151; WO 99/51266); Gliceraldehído-3-fosfato - deshidrogenasa (*Infect. Immun.* 1996 64:3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato *et al.* *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164:207-14); M like protein, SB patent application No. EP 0837130; and adhesin 18627, SB Patent application No. EP 0834568. Otros antígenos de proteína neumocócica preferidos son los que aparecen en WO 98/18931, particularmente aquellos seleccionados en WO 98/18930 y PCT/US99/30390.

Otros antígenos preferidos de proteína de *Streptococcus pneumoniae* de la invención son seleccionados del grupo compuesto por la familia triada de Polihistidina (Pht; en particular PhtA, PhtB, PhtD, o PhtE), familia Lyt (en particular LytA, LytB, o LytC), SpsA, Sp128, Sp130, Sp125, Sp101 y Sp133, o truncado o equivalente inmunológicamente funcional.

Para los propósitos de esta invención, "equivalente inmunológicamente funcional" se define como un péptido de proteína que contiene al menos un epítipo protector de las proteínas de la invención. Estos epítopos, por característica, están expuestos a la superficie, altamente conservados y pueden inducir una respuesta de anticuerpos bactericidas en un hospedero o prevenir efectos tóxicos. Preferiblemente, el equivalente funcional tiene por lo menos 15 y preferiblemente 30 o más aminoácidos contiguos de la proteína de la invención. Con mayor preferencia, las eliminaciones de la proteína, tales como las variantes de eliminación transmembrana (es decir, el uso del dominio extracelular de las proteínas), fusiones, derivados química o genéticamente destoxificados, etc, se pueden utilizar con la condición de que sean capaces de incrementar sustancialmente la misma respuesta inmune que la proteína nativa. La posición de los epítopos potenciales de células B en una secuencia de proteína puede determinarse fácilmente identificando los péptidos que están expuestos en la superficie y son antigénicos utilizando una combinación de dos métodos: predicción de la estructura 2D y predicción del índice antigénico. La predicción de la estructura 2D se puede hacer utilizando el programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). El índice antigénico se puede calcular sobre la base del método descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

La proteína *Streptococcus pneumoniae* de la invención se selecciona preferiblemente a partir del grupo compuesto por: una proteína de la familia triada de polihistidina (Pht), una proteína de la familia Lyt, una proteína de enlace con colina, proteínas que tienen un motivo LPXTG (donde X es cualquier aminoácido), proteínas que tienen un motivo de secuencia de señal tipo II de LXXC (donde X es cualquier aminoácido), y proteínas que tienen un motivo de secuencia de señal Tipo I. Los ejemplos que se prefieren dentro de estas categorías (o motivos) son las siguientes proteínas (o truncado o equivalente inmunológicamente funcional):

La familia Pht (Triada de polihistidina) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD, y PhtE. La familia se caracteriza por tener una secuencia de lípidos, dos dominios separados por una región rica en prolina y algunas triadas de histidina, que posiblemente participan en enlaces con metales o nucleósidos o en la actividad enzimática, (3-5) regiones espirales, un terminal N conservado y un terminal C heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos estudiadas. También se han encontrado proteínas homólogas en otros estreptococos y *Neisseria*. Los miembros de la familia que se prefieren son PhtA, PhtB y PhtD; preferiblemente PhtA

o PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos Pht A, B, D, y E se refieren a las proteínas que poseen secuencias como las referidas abajo, así como variantes que ocurren de forma natural (y preparadas por el hombre) que tienen una secuencia homóloga que es por lo menos 90% idéntica a las proteínas referidas. Preferiblemente es por lo menos 95% idéntica; con mayor preferencia 97% de identidad.

Con respecto a las proteínas Pht, PhtA aparece en WO 98/18930, y también es referida como Sp36. Como se observa arriba, es una proteína de la familia triada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II LXXC.

PhtD aparece en WO 00/37105, y también es referida como Sp036D. Como se observa arriba, también es una proteína de la familia triada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II LXXC.

PhtB aparece en WO 00/37105, y también es referida como Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido degradante C3, que aparece en WO 00/17370. Esta proteína también pertenece a la familia triada de polihistidina y posee el motivo de señal tipo II LXXC. Un equivalente inmunológicamente funcional que se prefiere es la proteína Sp42 que aparece en WO 98/18930. Un truncado PhtB (aproximadamente 79kD) aparece en WO99/15675 que también se considera miembro de la familia PhtX.

PhtE aparece en WO00/30299 y es referido como BVH-3.

SpsA es una proteína de enlace con colina (Cbp) que aparece en WO 98/39450.

La familia Lyt son proteínas asociadas con la membrana por lisis de células. El dominio terminal N comprende dominio(s) de enlace con colina; sin embargo, la familia Lyt no posee todas las características encontradas en la familia de las proteínas de enlace con colina (Cbp) familia que aparece abajo y por tanto para la presenta invención. La familia Lyt se considera diferente a la familia Cbp. Contrario a la familia Cbp, el dominio del terminal C contiene el dominio catalítico de la familia de proteínas Lyt. La familia comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia Lyt, LytA aparece en Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB aparece en WO 98/18930, y también es referida como Sp46. LytC también aparece en WO 98/18930, y también es referida como Sp91. Un miembro preferido de esa familia es LytC.

Otra expresión preferida son los truncados de la familia Lyt; "Lyt" se define arriba y "truncados" se refiere a las proteínas que carecen del 50% o más de la

región que se enlaza con colina. Generalmente estas proteínas carecen de la región completa que enlaza con colina.

5 Sp125 es un ejemplo de la proteína de superficie neumocócica con el motivo Sujeto a la Pared Celular LPXTG (donde X es cualquier aminoácido). Se ha encontrado que cualquier proteína dentro de esta clase de proteína superficial neumocócica con este motivo es útil en el contexto de esta invención, y por tanto se considera una proteína más de la invención. Sp125 aparece en WO 98/18930, y también se conoce como ZmpB – metaloproteinasa de zinc.

10 Sp101 aparece en WO 98/06734 (con referencia # y85993). Se caracteriza por una secuencia de señal Tipo I.

Sp133 aparece en WO 98/06734 (con referencia # y85992). También se caracteriza por una secuencia de señal Tipo I.

Sp128 y Sp130 aparecen en WO 00/76540.

15 Las proteínas utilizadas en la presente invención se seleccionan preferiblemente a partir del grupo PhtD y PhtA, o la combinación de ambas proteínas, o la combinación de una o las dos con CbpA.

Otros Aspectos de la Invención

20 Otros aspectos de la invención ofrecen: un método de producción de un compuesto multivalente de vesícula meningocócica o vacuna de la invención que comprende la combinación de una vesícula de actividad bactericida homóloga con una de actividad bactericida heteróloga; un método para la prevención o tratamiento de la enfermedad preferiblemente meningocócica, por neisseria que comprende la administración de una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de la invención (usualmente con un esquema de inmunización primaria de 3 dosis, con intervalos de 1-2 meses preferiblemente y con una dosis booster opcional) a un hospedero que lo necesite (preferiblemente niños de 2-4 años de edad o adolescentes, y por ventaja para infantes de menos de dos años(preferiblemente uno); y el uso de una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de la invención en la producción de un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad preferiblemente meningocócica, por neisseria (particularmente donde la prevención o tratamiento es a través de un esquema de inmunización primaria de 3 dosis [con intervalos de 1-2 meses preferiblemente y con una dosis booster opcional] y/o la prevención o tratamiento de la enfermedad es en un humano – preferiblemente de 2-4

25

30

años de edad o adolescente, y por ventaja un infante de menos de dos años (preferiblemente uno.)

EJEMPLOS DE REALIZACION

5 Los ejemplos que aparecen a continuación se realizan utilizando técnicas estándar que son todas conocidas y de rutina para aquellos adiestrados en este campo, excepto los que de otra manera se describen en detalle. Los ejemplos son ilustrativos pero no limitan la invención.

10 **Ejemplo 1: Construcción de una cepa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B que carece del principal antígeno inmunodominante PorA.**

Esto se describe en el Ejemplo 3 de WO 01/09350.

15 **Ejemplo 2: Beneficios de las vacunas multivalentes de la invención de vesículas meningocócicas**

20 Se han realizado muchos ensayos de eficacia con las vacunas de VME del serogrupo B. Dos vacunas específicas de VME se desarrollaron para combatir situaciones de epidemia en Cuba y Noruega debido a serosubtipos simples fundamentalmente, 4:P1.15 y 15:P1.16, respectivamente. Los ensayos de eficacia se han realizado en adolescentes en un estudio placebo, controlado, a doble ciego.. En Cuba se demostró una eficacia de 83% (intervalos de confianza: 42%-95%) con un período de seguimiento de 16 meses (Sierra NIPH Annals 1991, 14:195-207) mientras que en Noruega fue del 57% con un período de seguimiento de 29 meses (intervalo de confianza menor: 27%) (Bjune et al. NIPH Annals 1991 14:81-93). En Noruega, la eficacia fue del 86% en un período de seguimiento de 10 meses, y una tercera dosis demostró mejoramiento de la inmunogenicidad y de la persistencia de anticuerpos (Rosenquist, Infenct. Immun. 1995 63:4642-4652). Como los dos ensayos se realizaron en un marco fundamentalmente homólogo, no se pueden emitir conclusiones sobre protección cruzada.

30 Cuando se compara con la vacuna noruega en dos ensayos de confrontación directa y utilizando actividad bactericida cruzada frente a las respectivas cepas, la

vacuna cubana parece inducir un nivel mayor de actividad bactericida cruzada (ver Tabla1).

Tabla 1: Actividad Bactericida del Suero (ABS) inducida por la vacuna antimeningocócica BC del Instituto Finlay - %de respondedores ABS (Después de la 3 dosis)

5

Ensayo Islandés (Perkins et al, JID, 177, 1998, 683-691)				
Edad	N	15 : P1.16 (cepa noruega)	4:P1.15 (cepa cubana)	4:P1.4 (tipo NZ)
Finla 16-19 años y NIPH	74	48	44	36
	75	84	31	27
Ensayo chileno (Tappero, JAMA, 281, 1999, 1520-27)				
		15 : P1.16	4:P1.15	
Finla y	<1 año	31	90	
	2-4 años	41	78	
	17-30 años	56	67	
NIPH	<1 año	98	2	
	2-4 años	98	24	
	17-30 años	96	46	

Un respondedor ABS se definió como aquella persona con un incremento de 4 veces o más en el título ABS comparado con el título antes de la vacunación.

A los infantes y niños se le suministraron tres dosis de la vacuna del Finlay o control (Hib) con un intervalo de dos meses.

En los adultos, las dos primeras dosis fueron suministradas con un intervalo de dos meses. La tercera dosis se suministró dos meses después de la segunda dosis en el estudio chileno y un año después de la segunda dosis en el estudio islandés.

Se tomaron muestras de sangre antes de la vacunación y 4-6 semanas después de la segunda y tercera vacunación.

Los presentes innovadores han determinado que al comparar la actividad bactericida, la vacuna noruega se inclina hacia una respuesta más específica de la cepa mientras que la vacuna cubana induce una actividad bactericida más cruzada. Además, los presentes innovadores consideran que la vacuna cubana posee esa actividad porque es deficiente en PME inmunodominante, en particular PorA. Aunque

deficiente en PorA, la cantidad presente es suficiente para inducir una actividad bactericida homóloga, demostrada también por la vacuna cubana.

Los presentes innovadores han encontrado que una vacuna multivalente compuesta por una vesícula con actividad bactericida homóloga (con un serosubtipo prevalente en el país de uso) y una vesícula con actividad bactericida heteróloga ofrece una vacuna óptima que protege contra cepas epidémicas localmente prevalentes e incluso también ofrece protección heteróloga que disminuye las posibilidades de la aparición de nuevas cepas del serogrupo B que pudiera ocurrir después de la puesta en práctica de una campaña nacional de inmunización masiva cuando la prevalencia de la cepa epidémica disminuya.

Una vacuna óptima para Europea y/o Nueva Zelanda incorporará una combinación de dos vesículas separadas: P1.4 (cepa epidémica) y P1.15 (con actividad bactericida heteróloga –por ejemplo VME derivadas de la cepa CU-385 utilizada para preparar la vacuna comercial cubana VA-MENGOC-BC®). El objetivo de esta combinación es ofrecer protección homóloga de P1.4 así como retener la protección heteróloga de la cepa cubana P1.15.

Ejemplo 3: Vacuna Multivalente de Vesículas compuesta por vesículas que se derivan de la cepa meningocócica CU-385 (B:4:P1.19,15), y la cepa meningocócica de Nueva Zelanda (B:4:P1.7b,4)

La vacuna multivalente mencionada arriba fue producida (25 ug de cada vesícula en cada dosis para humanos, adyuvada con hidróxido de aluminio).

Los preparados monovalentes y bivalentes de vesículas se estudiaron para determinar si ocurría alguna interferencia inmune al combinar las vesículas.

El nivel de anticuerpos funcionales inducidos fue evaluado mediante una prueba bactericida realizada en ratones con un pool de muestras de suero.

En resumen, se inyectaron dos veces grupos de 10 ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) con el equivalente de 10 ug de proteína del granel monovalente o bivalente adsorbido en los días 0 y 21. Se tomaron muestras de sangre el día 35. La determinación de la actividad bactericida en los sueros se basó en la propiedad de los anticuerpos de inducir lisis bacteriana por activación del complemento. Después de incubar los sueros con meningococo B viable (las dos cepas de Nueva Zelanda: CY-385 y P1.4 fueron evaluadas), en presencia de complemento de conejo, se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en las muestras de suero. El

título bactericida es la más reciente dilución de suero que proporciona más del 50% de inactivación.

5

10

Basada en los resultados, la vacuna bivalente es inmunógena e induce anticuerpos funcionales. No hubo indicios de interferencia inmune cuando se mezclaron los dos monogranules.

15

20

25

30

35

COMPOSICIÓN VACUNAL

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto multivalente de vesícula meningocócica formado por un preparado de vesícula deficiente en PorA ya que posee menos del 80% de la cantidad de PorA comparado con la misma cantidad de vesículas elaboradas a partir de la cepa H44/76 y un preparado de vesícula que no es deficiente en PorA comparado con las vesículas elaboradas a partir de la cepa H44/76.
- 10 2. El compuesto multivalente de vesícula meningocócica de la solicitud 1, donde el preparado de vesícula que no es deficiente en PorA se deriva de la cepa meningocócica con un serosubtipo que es prevalente en un país de uso.
- 15 3. El compuesto multivalente de vesícula meningocócica de la solicitud 1 ó 2, donde el preparado de vesícula deficiente en PorA tiene menos del 22% de PorA de la proteína de vesícula total, o carece de PorA.
- 20 4. El compuesto multivalente de vesícula meningocócica de las solicitudes 1-3, donde el preparado de vesícula no deficiente en PorA tiene menos del 28% PorA de la proteína de vesícula total.
- 25 5. El compuesto multivalente de vesícula meningocócica de las solicitudes 1-4, donde el preparado de vesícula deficiente en PorA se deriva de la cepa meningocócica CU-385.
- 30 6. Una vacuna para el tratamiento de la enfermedad por neisseria, preferiblemente meningocócica, formada por el compuesto multivalente de vesícula meningocócica de las solicitudes 1-5, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La vacuna de la solicitud 6 compuesta además por uno o más polisacáridos capsulares meningocócicos, simples o conjugados, seleccionados de la siguiente lista de serotipos: A, C, Y y W.

58
59

8. La vacuna de la solicitud 6 ó 7 de uso conveniente en Nueva Zelanda o Europa donde el preparado de vesícula que no es deficiente en PorA se deriva de una cepa meningocócica con serosubtipo P1.4.

5 9. La vacuna de la solicitud 6 ó 7 de uso conveniente en Estados Unidos donde el preparado de vesícula que no es deficiente en PorA se deriva de la cepa meningocócica con un serosubtipo de P1.7,16.

10 10. La vacuna de la solicitud 6 ó 7 de uso conveniente en Noruega donde el preparado de vesícula que no es deficiente en PorA se deriva de una cepa meningocócica con un serosubtipo de P1.16.

15 11. Un método para la producción de un compuesto multivalente de vesícula meningocócica de las solicitudes 1-5 o la vacuna de las solicitudes 6-10 que comprende la combinación del preparado de vesícula que no es deficiente en PorA con el preparado de vesícula que es deficiente en PorA.

20 12. Un método para la prevención o tratamiento de la enfermedad por neisseria, preferiblemente meningocócica, que comprende la administración de una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de las solicitudes 6-10 a un hospedero que lo necesite.

25 13. El uso de una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de las solicitudes 6-10 en la producción de un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad por neisseria, preferiblemente meningocócica.

COMPOSICIÓN VACUNAL

RESUMEN

5

10

15

20

25

La presente invención está relacionada con compuestos vacunales para la prevención o tratamiento efectivos de la enfermedad, preferiblemente meningocócica, provocada por Neisseria. Las vacunas de la invención forman un compuesto multivalente de vesícula meningocócica que comprende por lo menos una vesícula con actividad bactericida homóloga que se deriva de una cepa meningocócica con un serosubtipo (inmunotipo PorA) que prevalece en el país de uso, y al menos una vesícula con actividad bactericida heteróloga que se deriva de una cepa meningocócica que no necesita tener un serosubtipo que prevalezca en el país de uso

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADORA
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 o 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:



Fecha:

2020

Bogotá D C

Doctor(a)

MARGARITA CASTELLANOS A.

11875

Apoderado(a)

**INSTITUTO FINLAY CENTRO DE INVESTIGACIÓN-PRODUCCIÓN VACUNAS
y SUEROS Y GLAXOSMITHKLINEBIOLOGICALS, S.A.**

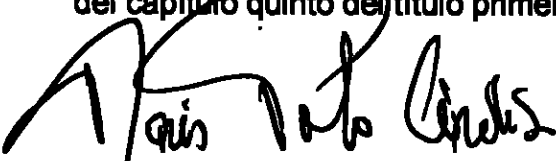
REFERENCIA:	Radicación N°	04-123996
	Solicitud internacional	PCT/EP03/06094
	Fecha inicio fase nacional	2005-01-13
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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 poder debidamente otorgado, con el lleno de 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 éste fuere una persona jurídica.
- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- El solicitante debe presentar un nuevo título, que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT, Art. 27, 27 Decisión 486, Circular Única 5.2.9).
- Si el examen preliminar Internacional contiene anexos estos deben ser adjuntados junto con su traducción. (Art. 36.2.b) del tratado PCT

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.


DORIS ELENA POLO CORDOBA

Jefe de la División de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

14 ENE. 2005
202063