



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

B.T.

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

05-7266

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

COMPOSICIONES DE URGENTE DE NUCLEOTIDAL
QUE COMPRENDEN UNA COMBINACION DE
ANTIGENOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 39/095

71. SOLICITANTE

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO

RUENSAART, BELGICA

74. APODERADO

GLORIA LOREDA RICHARTE T.P. 33.215

22. BOGOTÁ, D. C.,

28 ENERO 2005

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: 05087266 00000000 Folios: 239
 Fecha (ANI): 2005-01-28 15:39:37
 Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTM
 Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 02-Marzo-2005

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

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

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3284270 Fax: 6089701

E-mail: jllico@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

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

Teléfono: 3284270 Fax: 6089701

E-mail: jllico@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.890.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BERTHET, François-Xavier, Jacques; BIEMANS, Ralph; DENOEL, Philippe; FERON, Christiane; GORAJ, Karine; POOLMAN, Jan y WEYNANTS, Vincent.

Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2003/008571

Fecha: 31/07/03

Publicación Internacional No. WO 2004/014418 A3

Fecha: 19/02/04

⑥

Título (54)

"COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIA QUE COMPRENDEN UNA COMBINACION DE ANTIGENOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/095

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB
 GB
 GB
 GB
 GB
 GB
 GB
 GB
 GB
 GB
 GB

(32) Fecha

02/08/02
 02/08/02
 02/08/02
 02/08/02
 30/08/02
 30/08/02
 01/11/02
 01/11/02
 24/12/02
 24/12/02
 24/12/02
 05/03/03

(31) Número de Solicitud

0218037.0
 0218036.2
 0218035.4
 0218051.1
 0220197.8
 0220199.4
 0225524.8
 0225531.3
 0230164.8
 0230188.7
 0230170.3
 0305028.3

⑨

Comprobante de Pago No. 05 - 5.628

Fecha: 28/01/05

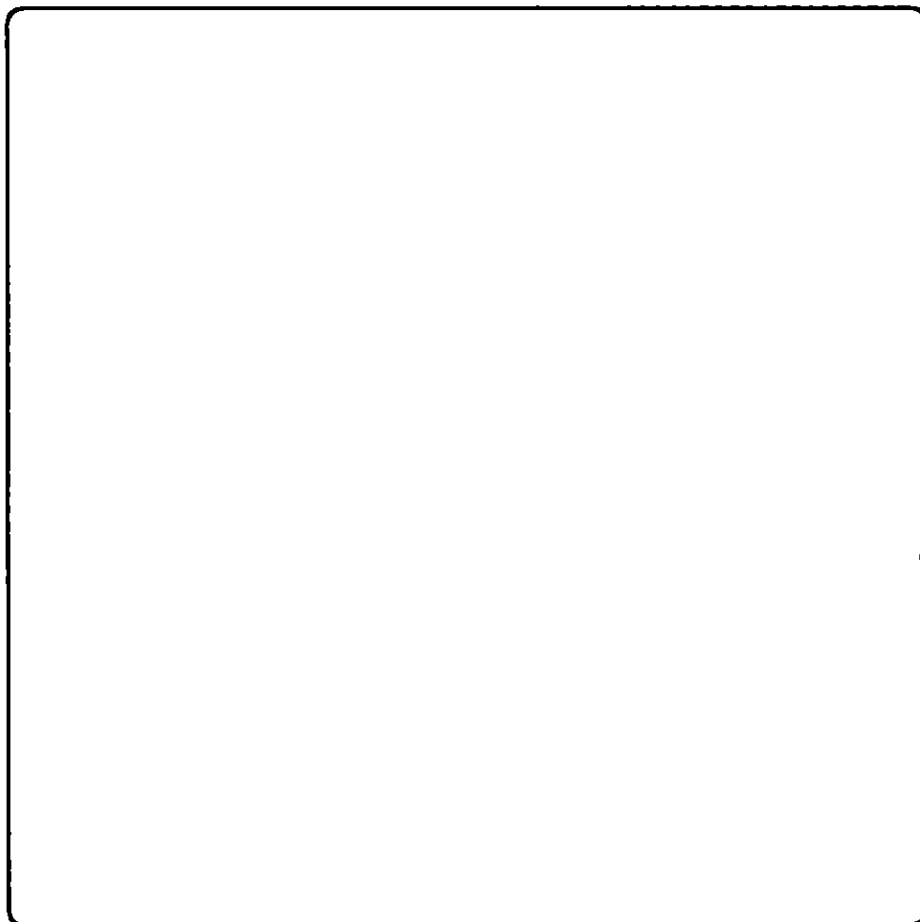
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documentos que acreditan la existencia y representación legal cuando los solicitantes sean personas jurídicas.
- ☒ Documentos de Representación Legal.
- ☐ 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.
- ☐ 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, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción y Solicitud de examen preliminar internacional.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: ALEGIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C: 39.890.713 T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 5,628
FECHA : ENERO 26 DE 2005

Radicacion : 80007256 80000000 Folios: 239
Fecha (APP): 2005-01-28 15:39:37
Tramite : 411 PC PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	30342303	26/01/2005	2,313,600.00

CONCEPTO

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	443,000.00

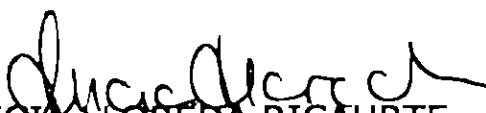
SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

4

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

PODER

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

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

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

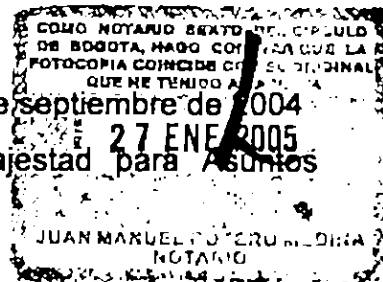
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

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

CERTIFICADO

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



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ms
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567
D. N. 12388061
LEY 1712 DE 2004
DOCUMENTOS QUE SE ENVIAN
A LAS FUNCIONES NOTARIAS
EN EL
BOGOTÁ D.C.
ENE 2005
EL NOTARIO
NOTARIO

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

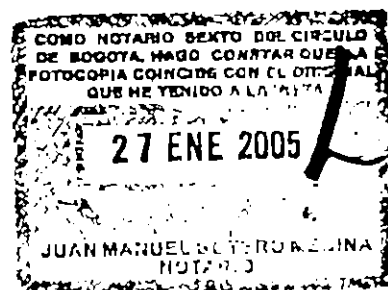
W. Glass
Por el Secretario de Estado

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

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



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

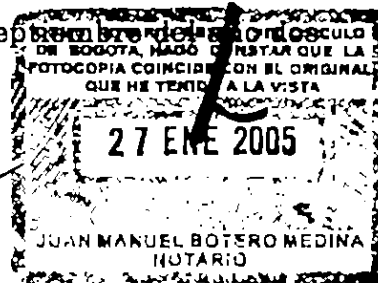
C E R T I F I C O:

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

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

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

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



JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



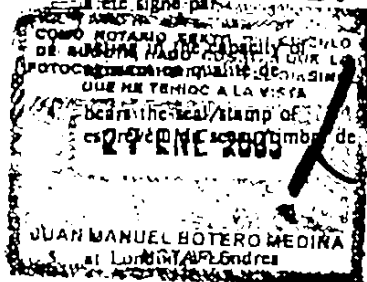
APOSTILLE

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

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

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by James Keef Milligan



Notary Public

Notary Public

Certified/Attesté

6. the/le 27-ENE-2003

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

8. Number/sous No G 749037

9. Stamp
timbre



10. Signature: WGLASS

WGLASS

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

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

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

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

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

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

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

Dado y firmado

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

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

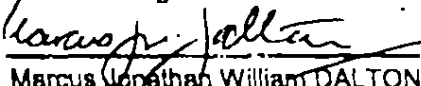
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial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

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

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

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorized Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Bélgica, domiciliada en la ciudad de Rixensart, Bélgica, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este Instrumento está comprendido dentro del de la sociedad. El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

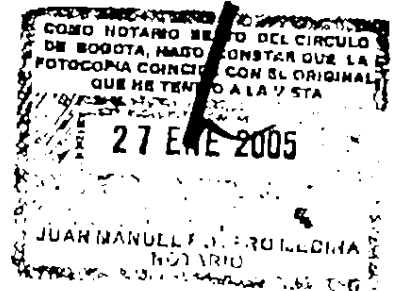
Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of 200 personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Belgium, domiciled at the City of Rixensart, Belgium, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this Instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company. The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



Fotos 10 y 11
tarjetas
a



EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

No. SOLICITUD

INTERNACIONAL : **PCT/EP2003/008571**

(51) INT. CL.: **A61K 39/095**

(21) No. SOLICITUD:

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: **28-01-2005**

(71) SOLICITANTE: **GLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A.**

(30) PRIORIDAD: 0218037.0 0225524.8
0218036.2 0225531.3
0218035.4 0230164.6
0218051.1 0230168.7

(31) No. DE SOLICITUD: 0220197.8 0230170.3
0220199.4 0305028.3

(72) INVENTOR/ES: BERTHET, Francois-Xavier,
Jacques; BIEMANS, Ralph;
DENOEL, Philippe; FERON,
Christiane; GORAJ, Karine;
POOLMAN, Jan y WEYNANTS,
Vincent.

(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 02/08/02 01/11/02
02/08/02 01/11/02
02/08/02 24/12/02
02/08/02 24/12/02
30/08/02 24/12/02
30/08/02 05/03/03

(74) REPRESENTANTE
LEGAL: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(33) PAÍS: **GB**

(54) TÍTULO:

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

(57) RESUMEN:

Reivindicación número 1.-

Una composición inmunogénica que comprende dos o más
antígenos diferentes en donde los antígenos se seleccionan de por lo
menos dos de las siguientes categorías:

- a) por lo menos una adhesina Neisserial;
- b) por lo menos una autotransportadora Neisserial;
- c) por lo menos una toxina Neisserial;
- d) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial;

por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial,
preferiblemente proteína de membrana exterior.

Reivindicación número 62.-

Una vacuna que comprende uno o más polinucleótido(s) que codifican dos o más diferentes proteínas cuya expresión se conduce a través de un promotor eucariótico, en donde las proteínas se seleccionan de por lo menos dos de las siguientes categorías:

a) por lo menos una adhesina *Neisserial* seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, PilC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119 y NadA;

b) por lo menos una autotransportadora *Neisserial* seleccionada del grupo que consiste de Hsf, Hap, proteasa IgA, AspA y NadA;

c) por lo menos una toxina *Neisserial* seleccionada del grupo que consiste de FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD y NM-ADPRT;

d) por lo menos una proteína de adquisición de Fe *Neisserial* seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, TbpB alto, TbpB bajo, LbpA, LbpB, P2086, HpuA, HpuB, Lipo28, Sibp, FbpA, BfrA, BfrB, Bcp, NMB0964 y NMB0293; o .

e) por lo menos una proteína asociada con membrana *Neisserial*, preferiblemente una proteína de membrana exterior integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, FhaC, NspA, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpA, HpuB, TspA, TspB, TdfH, PorB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, MltA, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA y PldA.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente CLJ/B45315	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/EP 03/08571	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 31/07/2003	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 02/08/2002
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 21 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la lista de la secuencia:

☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.

☐ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.

☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.

☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.

☒ se ha proporcionado la afirmación de que el listado de secuencias escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.

☒ se ha proporcionado la afirmación de que la información registrada en forma legible por computador es idéntica al listado de la secuencia escrita.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Recuadro I).

3. ☒ Falta unidad de invención (ver Recuadro II).

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

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

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No.

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

☒ Ninguna de las figuras.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08571

Cañilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 1 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Aunque la reivindicaciones 63-65, 80 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/ la composición.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente: ver INFORMACIONAL ADICIONAL hoja PCT/ISA/210
3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Cañilla II Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

VER HOJA ADICIONAL
como resultado del resumen de la prioridad abajo R. 40.2(e) PCT,
no serán solicitadas tasas adicionales

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☒ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
1-10, 45-81 (parcialmente), 11-16, 22-24, 27, 28, 82-91(completamente)
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☒ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

INFORMACIONA ADICIONAL CONTINUACION PCT/ISA/ 210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, a saber: :

1. Reivindicaciones: 1-5, 7-10, 45-91 (parcialmente), 16 (completamente)

Composiciones inmunogenicas que comprenden FhaB y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo. Las vacunas comprenden dicha composición inmunogénica; métodos de tratamiento de la enfermedad Neisserial que administra dichas vacunas.

El uso de dichas vacunas en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la infección Neisserial.

Cadena Neisserial diseñada genéticamente con una expresión regulada ascendentemente de FhaB y otro antígeno.

Métodos de preparación de dicha composición inmunogénica y vacunas.

Método de preparación de globulina inmune por la inmunización de un recipiente con dicha vacuna, globulina inmune preparada por este método, composición farmacéutica que comprende la administración de dicha composición farmacéutica

2. Reivindicaciones: 1-10, 45-91 (parcialmente), 17 (completamente)

ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NspA y otro antígeno o nucleótidos del mismo.

3. Reivindicaciones: 1-5, 7-10, 45-91 (parcialmente)

ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogénica que comprendan PilC y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.

4. Reivindicaciones: 1-10, 45-91 (parcialmente), 11-15, 24 (completamente)

ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan Hsg y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.

5. Reivindicaciones: 1-10, 13, 45-91 (parcialmente), 23 (completamente)

ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan Hap y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.

6. Reivindicaciones: 1-3, 5-10, 45-91 (parcialmente), 34 (completamente)

ver invención 1, pero relacionada con composiciones

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 210

que comprendan MafA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.

7. Reivindicaciones: 1-3, 5-10, 45-91 (parcialmente), 35 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan MafB y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
8. Reivindicaciones: 1-3, 5, 7, 9, 10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan Omp26 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
9. Reivindicaciones: 1- 5, 7-10, 45-91 (parcialmente), 36 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB00995 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
10. Reivindicaciones: 1-5, 7, 10, 45-91 (parcialmente), 37 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB00995 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
11. Reivindicaciones: 1- 5, 7-10, 45-91 (parcialmente), 37 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB1119 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
12. Reivindicaciones: 1-5, 7-10, 45-91 (parcialmente), 18 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NadA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
13. Reivindicaciones: 1-3, 5, 7, 9, 10, 45-91 (parcialmente)

INFORMACIÓN ADICIONAL CONTINUACIÓN PC/ISA/ 210

ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan proteasa IgA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.

14. Reivindicaciones: 1-3, 5, 10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan AspA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
15. Reivindicaciones: 1-5, 7-10, 13-15, 45-91 (parcialmente), 25 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan FrpA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
16. Reivindicaciones: 1-5, 7-10, 45-91 (parcialmente), 26 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan FrpC y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
17. Reivindicaciones: 1-3, 5, 7, 10, 45-91 (parcialmente), 36 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan FrpA/C y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
18. Reivindicaciones: 1-3, 5, 7, 9, 10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan VapD y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 210

19. Reivindicaciones: 1-3, 5-10, 45-91 (parcialmente), 33 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NM-ADPRT y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
20. Reivindicaciones: 1-10,45-81 (parcialmente), 14, 15, 27, 28, 82-91 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan LPS inmunotipo L1 y/o LPS inmunotipo L3 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
21. Reivindicaciones: 1-3, 5-10, 45-91 (parcialmente), 11,13, 15, 19 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan TbpA alto y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
22. Reivindicaciones: 1-3, 5-10, 45-91 (parcialmente), 12-15,20 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan TbpA baja y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
23. Reivindicaciones: 1-10, 45-91 (parcialmente)
Ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan TbpB alto y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 210

24. Reivindicaciones: 1-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan TbpB bajo y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
25. Reivindicaciones: 1-3, 5-10, 45-91 (parcialmente), 39 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan LbpA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
26. Reivindicaciones: 1-10, 13, 45-91 (parcialmente), 21 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan LbpB y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo.
27. Reivindicaciones: 1-3, 5-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan P2086 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
28. Reivindicaciones: 1-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan HpuA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
29. Reivindicaciones: 1-3, 5-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan HpuA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 210

- 30. Reivindicaciones: 1-5, 7-10, 45-91 (parcialmente), 41 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan Lipo28 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
- 31. Reivindicaciones: 1-3,5, 7, 9-10, 4-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan Sibp y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
- 32. Reivindicaciones: 1-3,5, 7, 9-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan FpbA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
- 33. Reivindicaciones: 1-3,5, 7, 9-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan BfrA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
- 34. Reivindicaciones: 1-3,5, 7, 9-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan BfrB y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 210

35. Reivindicaciones: 1-3,5, 7, 9-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan Bcp y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
36. Reivindicaciones 1-3,5, 7, 9-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB0964 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
37. Reivindicaciones 1-3,5, 7, 9-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB0293 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
38. Reivindicaciones 1-3,5, 7, 9-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan pilQ y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
39. Reivindicaciones 1-10, 13-15, 45-91 (parcialmente), 22 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan OMP85 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
40. Reivindicaciones 1-3,5-10 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan FhaC y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 210

- 41 Reivindicaciones 1-3,5-10 45-91 (parcialmente)
 ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan TspA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

- 42 Reivindicaciones 1-3,5-10, 45-91 (parcialmente)
 ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan TspB y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

- 43 Reivindicaciones 1-3,5-10, 45-91 (parcialmente)
 ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan TdfH y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

- 44. Reivindicaciones 1-3,5,10, 45-91 (parcialmente)
 ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan PorB y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

- 45 Reivindicaciones 1-3,5,10, 45-91 (parcialmente)
 ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan HimD y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 310

46. Reivindicaciones 1-3,5-10, 45-91 (parcialmente), 38 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan HisD y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
47. Reivindicaciones 1-3,5 -10, 45-91 (parcialmente), 32 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan GNA1870 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
48. Reivindicaciones 1-3,5 -10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan OstA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
49. Reivindicaciones 1-3,5 -10, 45-91 (parcialmente), 32 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan H1pA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
50. Reivindicaciones 1-3,5 -10, 45-91 (parcialmente), 31 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan M1tA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
51. Reivindicaciones 1-3,5, 7, 9, 10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB1124 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 21a
--

52. Reivindicaciones 1-3,5,7,10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB 1162 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
53. Reivindicaciones 1-3,5, 7, 9-10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB1220 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
54. Reivindicaciones 1-3,5, 7, 9 -10, 45-91 (parcialmente), 43 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB 1313 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
55. Reivindicaciones 1-3,5,7,9, 10, 45-91 (parcialmente), 44 (completamente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan NMB1953 y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo
56. Reivindicaciones 1-3,5, 7, 9 10, 45-91 (parcialmente)
ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que comprendan HtrA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION PC/ISA/ 210

57 Reivindicaciones 1–10, 45-91 (parcialmente)
 ver invención 1, pero relacionada con composiciones inmunogenicas que
 comprendan PIdA y otro antígeno Neisserial o nucleótidos del mismo

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08571

A. CLASIFICACION DE MATERIA IPC 7 A61K39/095 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) IPC 7 A61K Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados) EPO-Interno, BIOSIS, Dato WPI		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 01/09350 A (DALEMANS WILFRIED L J ; SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); THIRY GEORG) 8 de febrero de 2001 (2001-02-08) citado en la solicitud	1, 2, 5-7, 9, 11-13, 16, 20, 22, 24, 46-61, 63-69, 71, 72, 74-76,
Y	resumen página 20, línea 13 - línea 22 página 25, línea 11 - página 26, línea 24 -/-	1, 2, 5-16, 20, 22-24, 27, 28, 45-61, 63-69, 71, 72, 74-76, 82-91
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos. ☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.		
* Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'B' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'C' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica '&' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 20 de Abril de 2004		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 25.05.2004
Nombre y dirección del correo de ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax No. (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Noë, V

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08571

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	página 31, línea 1 - línea 22 página 33, línea 1 - página 34, línea 17 página 26, línea 5 - línea 32 ejemplo 8 reivindicaciones 14-20, 36, 37 — WO 00/71725 A (PIZZA MARIAGRAZIA; RAPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); GIULIANI M) 30 de Noviembre de 2000 (2000-11-30) citado en la solicitud	1-4, 11-13, 16, 20, 22-24, 62-68, 70, 76-81
Y	resumen página 1, línea 26 - línea 30 página 2, línea 12 - página 3, línea 1 página 54, línea 27 - página 55, línea 21 ejemplo 9	1-4, 11-16, 20, 22-24, 27, 28, 62-68, 70, 76-81
X	— WO 00/25811 A (GORRINGE ANDREW RICHARD; HUDSON MICHAEL JOHN (GB); MICROBIOLOGICAL) 11 de Mayo de 2000 (2000-05-11)	1-3, 20
Y	resumen página 3, línea 6 - línea 19 página 7, línea 5 - página 8, línea 3	4-8, 11, 12
X	— WO 01/52885 A (PIZZA MARIAGRAZIA; RAPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); GIULIANI M) 26 de Julio de 2001 (2001-07-26)	1, 2, 5-8, 11-13, 16, 20, 22, 24, 1, 2, 5-16, 20 22-24, 27, 28, 45-49, 52-61, 63, 64, 66, 67, 71-73, 76
Y	resumen página 2, línea 5 - línea 24 página 8, línea 24 - página 10, línea 17 página 33, línea 32 - página 35, línea 22 reivindicaciones 1, 2, 4-8 — -/-	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08571

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	WO 98/02547 A (RUELLE JEAN LOUIS; VINALS CARLA (BE); MAX PLANCK GESELLSCHAFT (DE)) 22 de Enero de 1998 (1998-01-22) citado en la solicitud página 81 – página 90 reivindicaciones 8, 23, 31	1-5, 7-10, 16, 45-81
Y	WO 99/31132 A (JENNINGS MICHAEL PAUL; PEAK IAN RICHARD ANSELM (AU); UNIV QUEENSLA) 24 de Junio de 1999 (1999-06-24) citado en la solicitud resumen página 2, línea 28 - página 3, línea 5 página 4, línea 1 – línea 6	1-15, 24, 45-82, 85
Y	página 7, línea 10 – línea 21 página 10, línea 3 – línea 15 página 29, línea 9 - página 30, línea 26 página 34, línea 10 – línea 17 página 37, línea 7 – línea 11 página 37, línea 32 – página 38, línea 11 página 39, línea 22 – línea 25	
Y	WO 01/55182 A (UNIV QUEENSLAND) 2 de Agosto de 2001 (2001-08-02) citado en la solicitud resumen página 2, línea 15 - línea 31 página 3, línea 7 – línea 8 página 5, línea 2 – línea 4 página 6, línea 5 – línea 11 página 11, línea 7 - línea 16 página 22, línea 27 – línea 31 página 28, línea 9 – línea 11 página 32, línea 6 – línea 12 página 34, línea 8 – línea 17 página 35, línea 1 – línea 5 ejemplo 10	1-15, 24 45-82, 85
Y	WO 99/55873 A (SMITHKLINE BEECHAN BIOLOG; THONNARD JOELLE (BE)) 4 de Noviembre de 1999 (1999-11-04) citado en la solicitud resumen página 3, línea 14 - línea 21 página 4, línea 1 – línea 10 página 25, línea 9 - línea 24 página 26, línea 9 – línea 10 página 32, línea 13 – página 33, línea 14 página 35, línea 4 – línea 6 página 36, línea 26 – página 37, línea 7 página 39, línea 1 – línea 19 ejemplo 3 reivindicaciones 17-19	1-10, 13 23, 45-81

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08571

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	JENNINGS H J ET AL: "CONJUGACIÓN DE OLIGOSACARIDOS TIPO-R LIPOPOLISACARIDO MENINGOCOCCAL AL TOXOIDE TETANUS COMO RUTA PARA UNA VACUNA POTENCIAL CONTRA MENINGITIDIS NEISSERIA DEL GRUPO B" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 43, No. 1, Enero 1984 (1984-01), páginas 407-412, XP009000590 ISSN: 0019-9567 resumen página 407, columna 1, paragrafo 1 página 409, columna 1, paragrafo 2 – columna 2, paragrafo 2 página 412, columna 1	1-10, 27, 28, 63, 64, 66, 67, 77, 78
Y	RUNE ANDERSEN S ET AL: "HETEROGENEIDAD LIPOPOLISACARIDA Y MECANISMOS DE ESCAPE DE MENINGITIDIS NEISSERIA: POSIBLES CONSECUENCIAS PARA EL DESARROLLO DE LA VACUNA" MICROBIAL PATHOGENESIS, ACADEMIC PRESS LIMITED, NEW YORK, NY, US, vol. 23, 1997, páginas 139-155, XP002108656 ISSN: 0882-4010 resumen página 140, columna 1, paragrafo 1 – paragrafo 4 página 149, columna 2, paragrafo 4 –página 150, columna 1, paragrafo 1	1, 2, 5-15, 28, 45-49, 52-61, 63-69, 71-76, 82-91
X	FREDRIKSEN J H ET AL: "PRODUCCION, CARACTERIZACION Y CONTROL DE FOLKEHELSE MENB-VACUNA UNA VACUNA DE VESICULA DE MEMBRANA EXTERNA CONTRA ENFERMEDAD MENINGOCOCCAL DEL GRUPO B" NIPH (NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH) ANNALS (OSLO), vol. 14, No. 2, 1991, páginas 67-80, XP002948832 MEETING ON THE MENINGOCOCCAL SEROGROUP B VACCINE PROTECCION TRIAL IN NORWAY 1988-1991, OSLO, NORWAY, ISSN: 0332-5652	1,2
Y	resumen página 68, paragrafo 6 – página 69 pagina 72, último paragrafo – página 75, paragrafo 4; figuras 2,3; tablas 2,3	5, 6, 28
Y	GAO LIHUI HU XUJING ET AL: "ESTUDIO SOBRE LA ANTIGENICIDAD LOS DE 2 CEPAS CANDIDATAS PARA VACUNA MENINGOCOCCAL DEL SEROGRUP B" BIOSIS, XP002133714 resumen	1-4, 15, 28

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08571

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	VERHEUL A F M ET AL: "PREPARACION, CARACTERIZACION E INMUNOGENECIDAD DE CONJUGADOS DE PROTEINA-OLIGOSACARIDO QUE CONTIENE EL GRUPO FOSFOETANOLAMINA DEL INMUNOTIPO MENINGOCOCCAL L2 Y L3, 7, 9. INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 59, No. 3, 1 de Marzo de 1991 (1991-03-01), páginas 843-851, XP002032436 ISSN: 0019-9567 resumen página 844, columna 2, última línea página 845, columna 1, paragrafo 2 página 847, columna 1, paragrafo 2 – columna 2, paragrafo 3 página 850, columna 2, último paragrafo	1-4, 27, 28, 50, 51, 61
A	QUAKYI E K AL: "LA MODULACION DE LAS ACTIVIDADES BIOLOGICAS DE ENDOTOXINAS MENINGOCOCCALES MEDIANTE LA ASOCIACION CON PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA NO ESTA ENLAZADA INEVITABLEMENTE A LA TOXICIDAD. INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 65, No. 5, Mayo 1997 (1997-05), páginas 1972-1979, XP001184760 ISSN: 0019-9567 resumen	
A	WO 01/72337 A (GORRINGE ANDREW RICHARD; HUDSON MICHAEL JOHN (GB); MICROBIOLOGICAL) 4 de Octubre de 2001 (2001-10-04), resumen página 8, línea 11 – línea 35 página 10, línea 1 – página 11, línea 10	
Y	WO 00/23595 A (JUDD RAPH C; MANNING SCOTT D (US); UNIV MONTANA (US)) 27 de Abril de 2000 (2000-04-27) citado en la solicitud resumen	1-10, 22, 45-49, 52-81, 86
Y	página 1, línea 8 – línea 11 página 6, línea 1 – línea 4 página 6, línea 26– línea 27 página 7, línea 3 – línea 14 página 8, línea 7 – línea 14 página 11, línea 17 – línea 24 página 33, línea 9 – línea 20 página 34, línea 12 – línea 18 página 35, paragrafo 2, 4 página 36, paragrafo 2, 4 página 37, línea 12 – línea 24 — -/-	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08571

28

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	JENNINGS M P ET AL: "ANALISIS MOLECULAR DE UN SITIO PARA LA BIOSINTESIS Y EXPRESION DE FASE VARIABLE DE LA ESTRUCTURA DE LIPOPOLISACARIDOS CON TERMINACION LACTO-N-TETRAOSA EN MENINGITIDIS NEISSERIA" MOLECULAR MICROBIOLOGY, BACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 18, No. 4, 1995, páginas 729-740, XP002084665 ISSN: 0950-382X resumen página 730, columna 1, paragrafo 2 página 731, columna 1, paragrafo 2 – columna 2, paragrafo 1 página 733, columna 1, paragrafo 2 – página 734, columna 1, paragrafo 2 página 737, columna 1, último paragrafo – columna 2	45-88,
A	WO 94/08021 A (LEY PETER ANDRE V D; NEDERLANDEN STAAT (NL); POOLMAN JAN THEUNIS ()) 14 de Abril de 1994 (1994-04-14) resumen página 5, línea 13 – página 6, línea 16 página 6, línea 31 – página 7, línea 8	82-91
A	VAN ULSEN PETER ET AL: "EXPRESION IN VIVO DE PROTEINAS DE MENINGITIDIS NEISSERIA HOMOLOGAS A LOS AUTOTRANSPORTADORES HAP Y HIS DE HAEMOHIUS INFLUENZAE" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY vol. 32, No. 1, Diciembre 2001 (2001-12), páginas 53-64, XP001189744 ISSN: 0928-8244 citado en la solicitud resumen página 54, columna 1, paragrafo 2 página 57, columna 2, paragrafo 3 – página 58 página 63, columna 1, último paragrafo – columna 2	
A	TETTELIN H ET AL: "SECUENCIA GENOMICA COMPLETA DE LA CEPA MC58 DE MENINGITIDIS NEISSERIA DEL SEROGRUPO B" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 287, 2000, páginas 1809 – 1815, XP000914963 ISSN: 0036-8075	
	— -/-	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08571

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda			Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO	0109350	A	08-02-2001	AU	770360 B2	19-02-2004
				AU	6833600 A	19-02-2001
				BR	0012974 A	07-05-2002
				CA	2380840 A1	08-02-2001
				CN	1377415 T	30-10-2002
				CZ	20020403 A3	15-05-2002
				WO	0109350 A2	08-02-2001
				EP	1208214 A2	29-05-2002
				HU	0203056 A2	28-12-2002
				JP	2003506049 T	18-02-2003
				NO	20020506 A	02-04-2002
				PL	353891 A1	15-12-2003
				TR	200200275 T2	21-05-2002
				TR	200202448 T2	21-01-2003
WO	0071725	A	30-11-2000	AU	5097700 A	12-12-2000
				BR	0010721 A	11-06-2002
				CA	2373236 A1	30-11-2000
				CN	1362992 T	07-08-2002
				EP	1179072 A2	13-02-2002
				CP	1179072 A2	13-02-2002
				WO	0071725 A2	30-11-2000
				JP	2003500420 T	07-01-2003
				NZ	515935 A	30-01-2004
WO	0025811	A	11-05-2000	AT	242640 T	15-06-2003
				AU	760858 B2	22-05-2003
				AU	1056900 A	22-05-2000
				BR	9914946 A	10-07-2001
				CA	2349331 A1	11-05-2000
				DE	69908805 D1	17-07-2003
				DK	1126874 T3	29-09-2003
				EP	1297844 A2	02-04-2003
				EP	1126874 A2	29-08-2001
				ES	2197688 T3	01-01-2004
				WO	0025811 A2	11-05-2000
				JP	2002528515 T	03-09-2002
				PT	1126874 T	31-10-2003
				US	2003215469 A1	20-11-2003
WO	0152885	A	26-07-2001	AU	2875401 A	31-07-2001
				CA	2397508 A1	26-07-2001
				CN	1416352 T	07-05-2003
				EP	1248647 A1	16-10-2002
				WO	0152885 A1	26-07-2001
				JP	2003520248 T	02-07-2003
				NZ	520466 A	26-09-2003
WO	9802547	A	22-01-1998	FR	2751000 A1	16-01-1998
				AU	730423 B2	08-03-2001
				AU	3697797 A	09-02-1998
				CA	2260079 A1	22-01-1998
				EP	0951552 A2	27-10-1999
				WO	9802547 A2	22-01-1998
				JP	2001504684 T	10-04-2001
				US	2002164603 A1	07-11-2002
WO	9931132	A	24-06-1999	AU	747742 B2	23-05-2002
				AU	1649599 A	05-07-1999

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.

PCT/EP 03/08571

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9931132 A		WO 9931132 A1 BR 9814276 A CA 2314319 A1 CN 1284965 T EP 1045859 A1 HU 0100094 A2 JP 2002508394 T NO 20002990 A NZ 505374 A PL 341160 A1 TR 200001709 T2 US 6495345 B1 US 2002102276 A1	24-06-1999 03-10-2000 24-06-1999 21-02-2001 25-10-2000 28-05-2001 19-03-2002 08-08-2000 01-03-2002 26-03-2001 21-03-2001 17-12-2002 01-08-2002
WO 0155182 A	02-08-2001	WO 0155182 A1 AU 2818101 A BR 0107857 A CA 2398139 A1 CN 1419564 T CZ 20022482 A3 EP 1252182 A1 HU 0300696 A2 JP 2003523208 T NO 20023487 A NZ 520445 A US 2002160016 A1	02-08-2001 07-08-2001 29-10-2002 02-08-2001 21-05-2003 15-01-2003 30-10-2002 28-07-2003 05-08-2003 24-09-2002 27-02-2004 31-10-2002
WO 9955873 A	04-11-1999	AU 3928499 A CA 2326375 A1 CN 1336957 T WO 9955873 A2 EP 1071783 A2 JP 2002512800 T US 6696062 B1	16-11-1999 04-11-1999 20-02-2002 04-11-1999 31-01-2001 08-05-2002 24-02-2004
WO 0172337 A	04-10-2001	AU 4260201 A CA 2403993 A1 EP 1267938 A1 WO 0172337 A1 JP 2003528157 T US 2003082211 A1	08-10-2001 04-10-2001 02-01-2003 04-10-2001 24-09-2003 01-05-2003
WO 0023595 A	27-04-2000	WO 0023595 A1 CA 2347849 A1 EP 1123403 A1	27-04-2000 27-04-2000 16-08-2001
WO 9408021 A	14-04-1994	NL 9201716 A AU 684720 B2 AU 4835193 A CA 2146145 A1 EP 0680512 A1 FI 951535 A JP 8501940 T WO 9408021 A1 NO 951181 A US 5705161 A	02-05-1994 08-01-1998 26-04-1994 14-04-1994 08-11-1995 01-06-1995 05-03-1996 14-04-1994 01-06-1995 06-01-1998

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CLJ/B45315	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP 03/08571	International filing date (day/month/year) 31/07/2003	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 02/08/2002
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 21 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:
- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

NEISSERIAL VACCINE COMPOSITIONS COMPRISING A COMBINATION OF ANTIGENS

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

- ☐ as suggested by the applicant.
- ☐ because the applicant failed to suggest a figure.
- ☐ because this figure better characterizes the invention.
- ☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 83/08571

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 63-65,80 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT, ☒
no additional fees are to be refunded.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-10,45-81 (partially),11-16,22-24,27,28,82-91 (completely)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 218

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-5,7-10,45-91 (partially),16 (completely)

Immunogenic compositions comprising FhaB and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.
Vaccines comprising said immunogenic composition;
methods of treatment of Neisserial disease administering said vaccines.
Use of said vaccines in the preparation of a medicament for the treatment and the prevention of Neisserial infection.
Genetically engineered Neisserial strain with upregulated expression of FhaB and the other antigen.
Methods of preparation of said immunogenic composition and vaccine.
Method of preparing an immune globulin by immunising a recipient with said vaccine, immune globulin prepared by this method, pharmaceutical composition comprising this immune globulin and method of treatment or prevention of Neisserial infection comprising administering said pharmaceutical composition.

2. Claims: 1-10,45-91 (partially),17 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NspA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

3. Claims: 1-5,7-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising PilC and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

4. Claims: 1-10,45-91 (partially),11-15,24 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising Hsf and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

5. Claims: 1-10,13,45-91 (partially), 23 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising Hap and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

6. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),34 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 218

comprising MafA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

7. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),35(completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising MafB and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

8. Claims: 1-3,5,7,9,10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising Omp26 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

9. Claims: 1-5,7-10,45-91 (partially),36 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB0315 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

10. Claims: 1-5,7-10,45-91 (partially),40 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB00995 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

11. Claims: 1-5,7-10,45-91 (partially),37(completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB1119 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

12. Claims: 1-5,7-10,45-91 (partially),18 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NadA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

13. Claims: 1-3,5,7,9,10,45-91 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising IgA protease and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

14. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising AspA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

15. Claims: 1-5,7-10,13-15,45-91 (partially),25 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising FrpA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

16. Claims: 1-5,7-10,45-91 (partially),26 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising FrpC and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

17. Claims: 1-3,5,7-10,45-91 (partially),36 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising FrpA/C and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

18. Claims: 1-3,5,7,9,10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising VapD and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 218

19. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),33 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NM-ADPRT and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

20. Claims: 1-10,45-81 (partially),14,15,27,28, 82-91 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising LPS immunotype L2 and/or LPS immunotype L3 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

21. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),11,13-15,19 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising TbpA high and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

22. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)12-15,20 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising TbpA low and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

23. Claims: 1-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising TbpB high and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

24. Claims: 1-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising TbpB low and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

25. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),39 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising LbpA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

26. Claims: 1-10,13-15,45-91 (partially),21.(completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising LbpB and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

27. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising P2886 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

28. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising HpuA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

29. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 218

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising HpuB and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

30. Claims: 1-5,7-10,45-91 (partially), 41 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising Lipo28 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

31. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising Sibp and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

32. Claims: 1-3,5,7-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising FpbA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

33. Claims: 1-3,5,9-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising BfrA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

34. Claims: 1-3,5,7,9,10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising BfrB and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 218

35. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising Bcp and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

36. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB8964 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

37. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB8293 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

38. Claims: 1-3,5,7-10,45-91 (partially),29 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising PilQ and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

39. Claims: 1-10,,13-15,45-91 (partially),22 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising OMP85 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

40. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/BA/ 210

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising FhaC and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

41. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising TspA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

42. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising TspB and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

43. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising TdfH and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

44. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising PorB and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

45. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),42 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising Hmd and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

46. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),38 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising HisD and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

47. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),32 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising GNA1870 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

48. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising OstA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

49. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),30 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising HlpA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

50. Claims: 1-3,5-10,45-91 (partially),31 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising MltA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

51. Claims: 1-3,5,7,9,10,45-91 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 218

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB1124 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

52. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB1162 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

53. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB1220 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

54. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially),43 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB1313 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

55. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially),44 (completely)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising NMB1953 and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

56. Claims: 1-3,5,7,9-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic compositions comprising HtrA and another Neisserial antigen or nucleotides thereof.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

57. Claims: 1-10,45-91 (partially)

see invention 1 but concerning immunogenic
compositions comprising PldA and another Neisserial antigen
or nucleotides thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/08571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/095

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/09350 A (DALENANS WILFRIED L J ;SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); THIRY GEORG) 8 February 2001 (2001-02-08) cited in the application	1,2,5-7, 9,11-13, 16,20, 22,24, 46-61, 63-69, 71,72, 74-76
Y	abstract page 20, line 13 - line 22 page 25, line 11 -page 26, line 24 -/--	1,2, 5-16,20, 22-24, 27,28, 45-61, 63-69, 71,72, 74-76, 82-91

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2004

Date of mailing of the international search report

25.05.2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noë, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/08571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	page 31, line 1 - line 22 page 33, line 1 -page 34, line 17 page 26, line 5 - line 32 example 8 claims 14-20,36,37 ---	
X	WO 00/71725 A (PIZZA MARIAGRAZIA ;RAPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); GIULIANI M) 30 November 2000 (2000-11-30) cited in the application	1-4, 11-13, 16,20, 22-24, 62-68, 70,76-81
Y	abstract	1-4, 11-16, 20, 22-24, 27,28, 62-68, 70,76-81
	page 1, line 26 - line 30 page 2, line 12 -page 3, line 1 page 54, line 27 -page 55, line 21 example 9 ---	
X	WO 00/25811 A (GORRINGE ANDREW RICHARD ;HUDSON MICHAEL JOHN (GB); MICROBIOLOGICAL) 11 May 2000 (2000-05-11)	1-3,20
Y	abstract	4-8,11, 12
	page 3, line 6 - line 19 page 7, line 5 -page 8, line 3 ---	
X	WO 01/52885 A (PIZZA MARIAGRAZIA ;RAPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); GIULIANI M) 26 July 2001 (2001-07-26)	1,2,5-8, 11-13, 16,20, 22-24
Y	abstract	1,2, 5-16,20, 22-24, 27,28, 45-49, 52-61, 63,64, 66,67, 71-73,76
	page 2, line 5 - line 24 page 8, line 24 -page 10, line 17 page 33, line 32 -page 35, line 22 claims 1,2,4-8 --- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/08571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98/02547 A (RUELLE JEAN LOUIS ;VINALS CARLA (BE); MAX PLANCK GESELLSCHAFT (DE)) 22 January 1998 (1998-01-22) cited in the application page 81 -page 90 claims 8,23,31 ---	1-5, 7-10,16, 45-81
Y	WO 99/31132 A (JENNINGS MICHAEL PAUL ;PEAK IAN RICHARD ANSELM (AU); UNIV QUEENSLA) 24 June 1999 (1999-06-24) cited in the application abstract page 2, line 28 -page 3, line 5 page 4, line 1 - line 6 page 7, line 10 - line 21 page 10, line 3 - line 15 page 29, line 9 -page 30, line 26 page 34, line 10 - line 17 page 37, line 7 - line 11 page 37, line 32 -page 38, line 11 page 39, line 22 - line 25 ---	1-15,24, 45-82,85
Y	WO 01/55182 A (UNIV QUEENSLAND) 2 August 2001 (2001-08-02) cited in the application abstract page 2, line 15 - line 31 page 3, line 7 - line 8 page 5, line 2 - line 4 page 6, line 5 - line 11 page 11, line 7 - line 16 page 22, line 27 - line 31 page 28, line 9 - line 11 page 32, line 6 - line 12 page 34, line 8 - line 17 page 35, line 1 - line 5 example 10 ---	1-15,24, 45-82,85
Y	WO 99/55873 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ;THONNARD JOELLE (BE)) 4 November 1999 (1999-11-04) cited in the application abstract page 3, line 14 - line 21 page 4, line 1 - line 10 page 25, line 9 - line 24 page 26, line 9 - line 10 page 32, line 13 -page 33, line 14 page 35, line 4 - line 6 page 36, line 26 -page 37, line 7 page 39, line 1 - line 19 example 3 claims 17-19 --- -/--	1-10,13, 23,45-81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JENNINGS H J ET AL: "CONJUGATION OF MENINGOCOCCAL LIPOPOLYSACCHARIDE R-TYPE OLIGOSACCHARIDES TO TETANUS TOXOID AS ROUTE TO A POTENTIAL VACCINE AGAINST GROUP B NEISSERIA MENINGITIDIS" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 43, no. 1, January 1984 (1984-01), pages 407-412, XP009000590 ISSN: 0019-9567 abstract page 407, column 1, paragraph 1 page 409, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 2 page 412, column 1	1-10,27, 28,63, 64,66, 67,77,78
Y	RUNE ANDERSEN S ET AL: "Lipopolysaccharide heterogeneity and escape mechanisms of Meisseria meningitidis: possible consequences for vaccine development" MICROBIAL PATHOGENESIS, ACADEMIC PRESS LIMITED, NEW YORK, NY, US, vol. 23, 1997, pages 139-155, XP002108656 ISSN: 0882-4010 abstract page 140, column 1, paragraph 1 - paragraph 4 page 149, column 2, paragraph 4 -page 150, column 1, paragraph 1	1,2, 5-15,28, 45-49, 52-61, 63-69, 71-76, 82-91
X	FREDRIKSEN J H ET AL: "PRODUCTION CHARACTERIZATION AND CONTROL OF MENB-VACCINE FOLKEHELSE AN OUTER MEMBRANE VESICLE VACCINE AGAINST GROUP B MENINGOCOCCAL DISEASE" NIPH (NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH) ANNALS (OSLO), vol. 14, no. 2, 1991, pages 67-80, XP002948832 MEETING ON THE MENINGOCOCCAL SEROGROUP B VACCINE PROTECTION TRIAL IN NORWAY 1988-1991, OSLO, NORWAY, ISSN: 0332-5652	1,2
Y	abstract page 68, paragraph 6 -page 69 page 72, last paragraph -page 75, paragraph 4; figures 2,3; tables 2,3	5,6,28
Y	GAO LIHUI HU XUJING ET AL: "Study on the LOS antigenicity of 2 candidate strains for meningococcal vaccine of serogroup B" BIOSIS, XP002133714 abstract	1-4,15, 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/08571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VERHEUL A F M ET AL: "PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND IMMUNOGENICITY OF MENINGOCOCCAL IMMUNOTYPE L2 AND L3,7,9 PHOSPHOETHANOLAMINE GROUP-CONTAINING OLIGOSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATES" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 59, no. 3, 1 March 1991 (1991-03-01), pages 843-851, XP002032436 ISSN: 0019-9567 abstract page 844, column 2, last line page 845, column 1, paragraph 1 page 847, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 3 page 850, column 2, last paragraph ---	1-4,27, 28,50, 51,61
A	QUAKYI E K ET AL: "MODULATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF MENINGOCOCCAL ENDOTOXINS BY ASSOCIATION WITH OUTER MEMBRANE PROTEINS IS NOT INEVITABLY LINKED TO TOXICITY" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 65, no. 5, May 1997 (1997-05), pages 1972-1979, XP001184768 ISSN: 0019-9567 abstract ---	
A	WO 01/72337 A (GORRINGE ANDREW RICHARD ;HUDSON MICHAEL JOHN (GB); MICROBIOLOGICAL) 4 October 2001 (2001-10-04) abstract page 8, line 11 - line 35 page 10, line 1 -page 11, line 10 ---	
Y	WO 00/23595 A (JUDD RALPH C ;MANNING SCOTT D (US); UNIV MONTANA (US)) 27 April 2000 (2000-04-27) cited in the application abstract page 1, line 8 - line 11 page 6, line 1 - line 4 page 6, line 26 - line 27 page 7, line 3 - line 14 page 8, line 7 - line 14 page 11, line 17 - line 24 page 33, line 9 - line 20 page 34, line 12 - line 18 page 35, paragraphs 2,4 page 36, paragraph 2 page 37, line 12 - line 24 ---	1-10,22, 45-49, 52-81,86
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/08571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JENNINGS M P ET AL: "Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-tetraose terminal lipopolysaccharides structure in Neisseria meningitidis" MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 18, no. 4, 1995, pages 729-740, XP002084665 ISSN: 0950-382X abstract page 730, column 1, paragraph 2 page 731, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 1 page 733, column 1, paragraph 2 -page 734, column 1, paragraph 2 page 737, column 1, last paragraph -column 2	45,88
A	WO 94/08021 A (LEY PETER ANDRE V D ;NEDERLANDEN STAAT (NL); POOLMAN JAN THEUNIS ()) 14 April 1994 (1994-04-14) abstract page 5, line 13 -page 6, line 16 page 6, line 31 -page 7, line 8	82-91
A	VAN ULSEN PETER ET AL: "In vivo expression of Neisseria meningitidis proteins homologous to the Haemophilus influenzae Hap and Hia autotransporters" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 1, December 2001 (2001-12), pages 53-64, XP001189744 ISSN: 0928-8244 cited in the application abstract page 54, column 1, paragraph 2 page 57, column 2, paragraph 3 -page 58 page 63, column 1, last paragraph -column 2	
A	TETTELIN H ET AL: "COMPLETE GENOME SEQUENCE OF NEISSERIA MENINGITIDIS SEROGROUP B STRAIN MC58" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 287, 2000, pages 1809-1815, XP000914963 ISSN: 0036-8075	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0109350	A	08-02-2001	
		AU 770360 B2	19-02-2004
		AU 6833600 A	19-02-2001
		BR 0012974 A	07-05-2002
		CA 2380840 A1	08-02-2001
		CN 1377415 T	30-10-2002
		CZ 20020403 A3	15-05-2002
		WO 0109350 A2	08-02-2001
		EP 1208214 A2	29-05-2002
		HU 0203056 A2	28-12-2002
		JP 2003506049 T	18-02-2003
		NO 20020506 A	02-04-2002
		PL 353891 A1	15-12-2003
		TR 200200275 T2	21-05-2002
		TR 200202448 T2	21-01-2003
WO 0071725	A	30-11-2000	
		AU 5097700 A	12-12-2000
		BR 0010721 A	11-06-2002
		CA 2373236 A1	30-11-2000
		CN 1362992 T	07-08-2002
		EP 1179072 A2	13-02-2002
		WO 0071725 A2	30-11-2000
		JP 2003500420 T	07-01-2003
		NZ 515935 A	30-01-2004
WO 0025811	A	11-05-2000	
		AT 242640 T	15-06-2003
		AU 760858 B2	22-05-2003
		AU 1056900 A	22-05-2000
		BR 9914946 A	10-07-2001
		CA 2349331 A1	11-05-2000
		DE 69908805 D1	17-07-2003
		DK 1126874 T3	29-09-2003
		EP 1297844 A2	02-04-2003
		EP 1126874 A2	29-08-2001
		ES 2197688 T3	01-01-2004
		WO 0025811 A2	11-05-2000
		JP 2002520515 T	03-09-2002
		PT 1126874 T	31-10-2003
		US 2003215469 A1	20-11-2003
WO 0152885	A	26-07-2001	
		AU 2875401 A	31-07-2001
		CA 2397508 A1	26-07-2001
		CN 1416352 T	07-05-2003
		EP 1248647 A1	16-10-2002
		WO 0152885 A1	26-07-2001
		JP 2003520248 T	02-07-2003
		NZ 520466 A	26-09-2003
WO 9802547	A	22-01-1998	
		FR 2751000 A1	16-01-1998
		AU 730423 B2	08-03-2001
		AU 3697797 A	09-02-1998
		CA 2260079 A1	22-01-1998
		EP 0951552 A2	27-10-1999
		WO 9802547 A2	22-01-1998
		JP 2001504684 T	10-04-2001
		US 2002164603 A1	07-11-2002
WO 9931132	A	24-06-1999	
		AU 747742 B2	23-05-2002
		AU 1649599 A	05-07-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9931132 A		WO 9931132 A1	24-06-1999
		BR 9814276 A	03-10-2000
		CA 2314319 A1	24-06-1999
		CN 1284965 T	21-02-2001
		EP 1045859 A1	25-10-2000
		HU 0108094 A2	28-05-2001
		JP 2002508394 T	19-03-2002
		NO 20002990 A	08-08-2000
		NZ 505374 A	01-03-2002
		PL 341160 A1	26-03-2001
		TR 200001709 T2	21-03-2001
		US 6495345 B1	17-12-2002
		US 2002102276 A1	01-08-2002
WO 0155182 A	02-08-2001	WO 0155182 A1	02-08-2001
		AU 2818101 A	07-08-2001
		BR 0107857 A	29-10-2002
		CA 2398139 A1	02-08-2001
		CN 1419564 T	21-05-2003
		CZ 20022482 A3	15-01-2003
		EP 1252182 A1	30-10-2002
		HU 0300696 A2	28-07-2003
		JP 2003523208 T	05-08-2003
		NO 20023487 A	24-09-2002
		NZ 520445 A	27-02-2004
		US 2002160016 A1	31-10-2002
WO 9955873 A	04-11-1999	AU 3928499 A	16-11-1999
		CA 2326375 A1	04-11-1999
		CN 1336957 T	20-02-2002
		WO 9955873 A2	04-11-1999
		EP 1071783 A2	31-01-2001
		JP 2002512800 T	08-05-2002
		US 6696062 B1	24-02-2004
WO 0172337 A	04-10-2001	AU 4260201 A	08-10-2001
		CA 2403993 A1	04-10-2001
		EP 1267938 A1	02-01-2003
		WO 0172337 A1	04-10-2001
		JP 2003528157 T	24-09-2003
		US 2003082211 A1	01-05-2003
WO 0023595 A	27-04-2000	WO 0023595 A1	27-04-2000
		CA 2347849 A1	27-04-2000
		EP 1123403 A1	16-08-2001
WO 9408021 A	14-04-1994	NL 9201716 A	02-05-1994
		AU 684720 B2	08-01-1998
		AU 4835193 A	26-04-1994
		CA 2146145 A1	14-04-1994
		EP 0680512 A1	08-11-1995
		FI 951535 A	01-06-1995
		JP 8501940 T	05-03-1996
		WO 9408021 A1	14-04-1994
		NO 951181 A	01-06-1995
		US 5705161 A	06-01-1998

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional

19 de Febrero de 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2004/014418 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 39/095

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/EP2003/008571

(22) Fecha de Registro Internacional: 31 de Julio de 2003
(31.07.2003)

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación: INGLES

(30) Información de Prioridad:

0218037.0	2 de Agosto de 2002	(02.08.2002)	GB
0218036.2	2 de Agosto de 2002	(02.08.2002)	GB
0218035.4	2 de Agosto de 2002	(02.08.2002)	GB
0218051.1	2 de Agosto de 2002	(02.08.2002)	GB
0220197.8	30 de Agosto de 2002	(30.08.2002)	GB
0220199.4	30 de Agosto de 2002	(30.08.2002)	GB
0225524.8	1 de Noviembre de 2002	(01.11.2002)	GB
0225531.3	1 de Noviembre de 2002	(01.11.2002)	GB
0230164.6	24 de Diciembre de 2002	(24.12.2002)	GB
0230168.7	24 de Diciembre de 2002	(24.12.2002)	GB
0230170.3	24 de Diciembre de 2002	(24.12.2002)	GB
0305028.3	5 de Marzo de 2003	(05.03.2003)	GB

(71) Solicitante: (para todos los estados designados, excepto Estados Unidos de América): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/Solicitantes (para los Estados Unidos de América únicamente): BERTHET, François-Xavier, Jacques [FR/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). BIEMANS, Ralph [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). DENOEL, Philippe [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). FERON, Christiane [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). GORAJ, Karlne [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). POOLMAN, Jan [NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). WEYNANTS, Vincent [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).

(74) Agente: STEPHEN, Robert; GlaxoSmithKline, GSK House, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).

(81) Estados Designados (nacionales): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regionales): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) patente europea (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) patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con reporte de búsqueda internacional y para ser publicado con la bajo el recibido de este reporte.

— Antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Gúlas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

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

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

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 February 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/014418 A3

- (31) International Patent Classification⁷: A61K 39095
- (21) International Application Number:
PCT/EP2003/008571
- (22) International Filing Date: 31 July 2003 (31.07.2003)
- (13) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- | | | |
|-----------|-------------------------------|----|
| 0218037.0 | 2 August 2002 (02.08.2002) | GB |
| 0218036.2 | 2 August 2002 (02.08.2002) | GB |
| 0218033.4 | 2 August 2002 (02.08.2002) | GB |
| 0218051.1 | 2 August 2002 (02.08.2002) | GB |
| 0220197.8 | 30 August 2002 (30.08.2002) | GB |
| 0220198.4 | 30 August 2002 (30.08.2002) | GB |
| 0225524.8 | 1 November 2002 (01.11.2002) | GB |
| 0225531.3 | 1 November 2002 (01.11.2002) | GB |
| 0230164.6 | 24 December 2002 (24.12.2002) | GB |
| 0230168.7 | 24 December 2002 (24.12.2002) | GB |
| 0230170.3 | 24 December 2002 (24.12.2002) | GB |
| 0305028.3 | 5 March 2003 (05.03.2003) | GB |
- (71) Applicant (for all designated States except US): GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).
- (72) Inventors and
(73) Inventors/Applicants (for US only): HERTHY, Fran-
cois-Xavier, Jacques [FR/BE]; GlaxoSmithKline Biolog-
icals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels
(BE). BIKMANS, Ralph [BE/BE]; GlaxoSmithKline Bio-
logicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels
(BE). DEMOUL, Philippe [BE/BE]; GlaxoSmithKline Bi-
ologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brus-
sels (BE). FIERON, Christophe [BE/BE]; GlaxoSmithK-
line Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart
- Brussels (BE). GORAJ, Karina [BE/BE]; GlaxoSmithK-
line Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart
Brussels (BE). POOLMAN, Jans [NL/BE]; GlaxoSmithK-
line Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart
Brussels (BE). WEYNANTS, Vincent [BE/BE]; Glaxo-
SmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart Brussels (BE).
- (74) Agent: STEPHEN, Robert; GlaxoSmithKline, GSK
House, 960 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8
9EP (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AU, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GH, GM,
GN, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patents (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).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- (86) Date of publication of the international search report:
22 July 2004
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2004/014418 A3

(54) TITLE: NEISSERIAL VACCINE COMPOSITIONS COMPRISING A COMBINATION OF ANTIGENS

(57) Abstract: The present invention relates to immunogenic compositions and vaccines for the treatment and prevention of Neisserial disease. Immunogenic compositions of the invention contain combinations of antigens selected from at least two different classes of antigens including adhesins, autotransporter proteins, toxins, iron acquisition proteins and membrane-associated proteins (preferably integral outer membrane proteins). Such combinations of antigens are able to target the immune response against different aspects of the neisserial life cycle, resulting in a more effective immune response.

54

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:
IPEA/ _____

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only			
Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND	
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference CLJ/B45315	
International application No. PCT/EP03/08571	International filing date (day/month/year) 31 July 2003 (31.07.03)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 02 August 2002 (02.08.02)	
Title of invention VACCINE COMPOSITION			
Box No. II APPLICANT(S)			
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) GlaxoSmithKline Biologicals S.A. Rue de l'Institut 89 B-1330 Rixensart Belgium		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		Teleprinter No.	
		Applicant's registration No. with the Office	
State (that is, country) of nationality: BE		State (that is, country) of residence: BE	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) BERTHET, Francois-Xavier Jacques c/o GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rue de l'Institut 89 B-1330 Rixensart Belgium			
State (that is, country) of nationality: FR		State (that is, country) of residence: BE	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) BIEMANS, Ralph GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rue de l'Institut 89 B-1330 Rixensart Belgium			
State (that is, country) of nationality: BE		State (that is, country) of residence: BE	
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.			

Sheet No. 2

International application No.
PCT/EP03/08571

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

DENOEL, Philippe
GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
Rue de l'Institut 89
B-1330 Rixensart
Belgium

State (that is, country) of nationality:
BE

State (that is, country) of residence:
BE

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

FERON, Christiane
GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
Rue de l'Institut 89
B-1330 Rixensart
Belgium

State (that is, country) of nationality:
BE

State (that is, country) of residence:
BE

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

GORAJ, Karine
GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
Rue de l'Institut 89
B-1330 Rixensart
Belgium

State (that is, country) of nationality:
BE

State (that is, country) of residence:
BE

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

POOLMAN, Jan
GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
Rue de l'Institut 89
B-1330 Rixensart
Belgium

State (that is, country) of nationality:
NL

State (that is, country) of residence:
BE

☒ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.</i>	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i> WEYNANTS, Vincent GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rue de l'Institut 89 B-1330 Rixensart Belgium	
State <i>(that is, country)</i> of nationality: BE	State <i>(that is, country)</i> of residence: BE
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i>	
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i>	
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i>	
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.	

57

Sheet No. 4

International application No.
PCT/EP03/08571

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representative

and ☐ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.

☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.

☒ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)

GIDDINGS, Peter John
GlaxoSmithKline, C.I.P. (CN925.1)
980 Great West Road, Brentford,
Middlesex, TW8 9GS
United Kingdom

Telephone No.

020 8047 4414

Facsimile No.

020 8047 6894

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filed

the description ☐ as originally filed

☐ as amended under Article 34

the claims ☐ as originally filed

☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)

☐ as amended under Article 34

the drawings ☐ as originally filed

☐ as amended under Article 34

2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. ☒ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).

4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54bis.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: ENGLISH

☒ which is the language in which the international application was filed.

☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.

☐ which is the language of publication of the international application.

☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|--|---|----------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | 1 sheets |
| 6. other (specify) | : | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

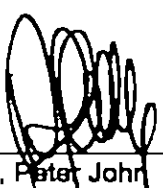
received	not received
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|---|--|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ tables in computer readable form related to a sequence listing |
| 4. ☒ copy of general power of attorney, reference number, if any. | 8. ☐ other (specify): |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).


GIDDINGS, Peter John
Agent for the Applicants

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

- | | |
|--|--|
| 3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
☐ The applicant has been informed accordingly. | 6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply. |
| 4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5. | 7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54bis.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5. |
| 5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82. | 8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82. |

For International Bureau use only

Demand received from IPBA on:

COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN
UNA COMBINACION DE ANTIGENOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

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

20

COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIA QUE COMPRENDEN
UNA COMBINACION DE ANTIGENOS

CAMPO TECNICO

5

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

15

ANTECEDENTES

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

Neisseria gonorrhoeae es el agente etiológico de gonorrea, una de las enfermedades sexualmente transmitidas más frecuentemente reportadas en el mundo con una incidencia anual estimada de 82
25 millones de casos (Gerbase y otros, 1998 Lancet 351; (Supl. 3) 2-4).

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

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

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

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

Las vacunas basadas en el polisacárido capsular de los serogrupos A, C, W e Y han desarrollado y han mostrado que controlan los brotes de la enfermedad meningocócica (Peltola y otros, 1985 *Pediatrics* 76; 91-96). Sin embargo, el serogrupo B es
5 pobremente inmunogénico e induce solamente una respuesta de anticuerpo temporal de un isotipo predominantemente IgM (Ala'Aldeen D y Cartwright K 1996, *J. Infect.* 33; 153-157). Por consiguiente no existe una vacuna ampliamente efectiva actualmente disponible contra los meningococos del serogrupo B, los cuales son
10 responsables de la mayoría de las enfermedades en los países más templados. Esto es particularmente problemático ya que la incidencia de la enfermedad del serotipo B está aumentando en Europa, Australia y América, en su mayor parte en niños menores de 5 años. El desarrollo de una vacuna contra los meningococos del serogrupo
15 B presenta dificultades particulares porque la cápsula del polisacárido es pobremente inmunogénico debido a su similitud inmunológica a la molécula de adhesión de la célula neural humana. Las estrategias para la producción de vacunas tienen por consiguiente concentradas en la superficie, estructuras expuestas de
20 la membrana exterior meningocócica pero han sido obstaculizadas a través de la variación marcada en estos antígenos entre las cepas.

Los desarrollos adicionales han conducido a la introducción de vacunas hechas de vesículas de membrana externas que contendrán un número de proteínas que forman el contenido normal de la
25 membrana bacterial. Una de estas es la vacuna VA-MENGOC-BC

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

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

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 9. Un gel teñido con Coomassie mostrando los niveles

de expresión de Hsf, TbpA y NspA en las preparaciones de la vesícula de membrana exterior derivada de diferentes cepas de *N. meningitidis*. Carril 1 – marcadores de peso molecular; carril 2 – vesículas de la membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares fueron regulados de manera descendente; carril 3 – vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente; carril 4 – vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente y Hsf fue regulado de manera ascendente; carril 5 - vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente y TbpA fue regulado de manera ascendente; carril 6 - vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente y TbpA y Hsf fueron regulados de manera ascendente; carril 7 - vesículas de membrana exterior preparadas de la cepa H44/76 en la cual los polisacáridos capsulares y PorA fueron regulados de manera descendente y TbpA y NspA fueron regulados de manera ascendente.

DESCRIPCION DETALLADA

La presente invención describe combinaciones particulares de

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

cinco grupos de proteínas seleccionados a partir de lo siguiente:

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

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

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

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

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

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

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

25 Preferiblemente los cinco grupos de antígeno se representan

en la composición inmunogénica de la invención.

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

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

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

Antígenos de la invención

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

15

1. Adhesinas

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

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

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

FhaB

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

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

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

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

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

2. *Proteínas autotransportadoras*

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

Hsf

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

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

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

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

Los fragmentos preferidos de Hsf por lo tanto incluyen la región principal completa de Hsf, preferiblemente conteniendo los aminoácidos 52-473. Los fragmentos preferidos adicionales de Hsf incluyen regiones expuestas en la superficie de la principal incluyendo una o más de las siguientes secuencias de aminoácido: 52-62, 76-93, 116-134, 147-157, 157-175, 189-211, 230-252, 252-270, 284-306, 328-338, 362-391, 408-418, 430-440 y 469-479.

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

Hap

El análisis por computadora de la proteína de tipo Hap de *Neisseria meningitidis* reveló por lo menos tres dominios estructurales. Considerando la secuencia de tipo Hap de la cepa H44/76 como una referencia, el Dominio 1, comprende el aminoácido 1 a 42, codifica un péptido de señal dependiente de sec
5 característico de la familia auto-transportadora, el Dominio 2, comprende los aminoácidos 43 a 950, codifica el dominio pasajero probable de ser expuesto en la superficie y accesible al sistema
10 inmune, el Dominio 3, comprende los residuos 951 al término C (1457), se pronostica que codifica cepas beta que probablemente se ensamblan dentro de la estructura de tipo barril y que van a ser ancladas en la membrana exterior. Dicho dominio 2 será
probablemente expuesto en la superficie, bien conservado (más de
15 80% en todas las cepas probadas) y podría ser producido como antígenos de subunidad en *E. coli*, representa candidatos de vacuna interesantes. Ya que los dominios 2 y 3 probablemente van a estar
expuestos en la superficie, están bien conservados (Pizza y otros (2000), Science 287: 1816-1820), representan candidatos de vacuna
20 interesantes. El dominio 2 es conocido como el dominio pasajero.

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

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

3. *Proteínas de adquisición de Hierro*

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

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

5 TbpA

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

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

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

TbpA contiene varias regiones distintas. Por ejemplo, en el caso de TbpA de la cepa H44/76 de *N. meningitidis*, los 188 aminoácidos del término amino forman un dominio globular interno, 22 cepas beta se extienden en la membrana, formando una estructura de barril beta. Estas están enlazadas a través de bucles intracelulares cortos y bucles extracelulares largos. Los bucles extracelulares 2, 3, y 5 tiene el grado más alto de variabilidad de secuencia y el bucle 5 está expuesto en la superficie. Los bucles 5 y 4 están involucrados en la unión a ligando.

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

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

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

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

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

4. Toxinas

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

FrpA y FrpC

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

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

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

25 Dichos truncados tienen propiedades ventajosas sobre las

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

- Inmunogénicas de la invención.

5 Las secuencias conservadas entre FrpA y FrpC se designan FrpA/C y donde quiera que FrpA y FrpC formen un constituyente de las composiciones inmunogénicas de la invención, FrpA/C podrá ser ventajosamente utilizada. Los aminoácidos 277-1004 de la secuencia FrpA es la región conservada preferida. Las secuencias anteriores

10 pueden extenderse o truncarse por hasta 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos en cualquiera o ambos términos N o C.

LPS

LPS (lipopolisacárido, también conocido como LOS -

15 lipooligosacárido) es la endotoxina en la membrana exterior de Neisseria. La porción de polisacárido de LPS se sabe que induce anticuerpos bacterianos.

La heterogeneidad entre la porción del oligosacárido de LPS genera una diversidad estructural y antigénica entre las diferentes

20 cepas neisserial (Griffiss y otros Inf. Immun. 1987; 55: 1792-1800). Esta se ha utilizado para subdividir cepas meningocólicas en 12 inmunotipos (Scholtan y otros J Med Microbiol 1994, 41: 236-243). Los inmunotipos L3, L7 y L9 son inmunológicamente idénticos y son estructuralmente similares (o aún el mismo) y por lo tanto han sido

25 designados L3,7,9 (o, para los propósitos de esta especificación,

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

Cuando se incluye LPS, preferiblemente LPS meningocócico en una vacuna de la invención, preferiblemente y ventajosamente cualquiera o ambos de los inmutipos L2 y L3 están presentes. LPS está preferiblemente presente en la vesícula de la membrana exterior (preferiblemente cuando la vesícula se extrae con un bajo porcentaje de detergente, más preferiblemente 0-0.5%, 0.02-0.4%, 0.04-0.3%, 0.06-0.2%, 0.08-0.15% o 0.1%, más preferiblemente deoxicolato [DOC] pero también puede ser parte de una vacuna de subunidad. LPS puede ser aislado utilizando procedimientos bien conocidos incluyendo el procedimiento de agua caliente-fenol (Wesphal y Jann Meth. Carbo. Chem. 5; 83-91 1965). Ver también Galanos y otros 1989, Eur J Biochem 9: 245-249, y Wu y otros 1987, Anal Bio Chem 160: 281-289. LPS puede ser utilizado claro o conjugado a una fuente de epítomos de célula T como anatoxina de tétano, anatoxina de difteria, CRM-197 o proteínas de membrana exterior OMV. Las técnicas para conjugar LOS aislados también son conocidas (ver por ejemplo EP 941738 Incorporada aquí por referencia).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El proceso de conjugación EDAC/NHS es un proceso preferido para conjugación intra-ampolla. EDAC/NHS es preferido para formaldehído el cual puede entrelazarse a muy alto grado, de esta forma adversamente afecta la capacidad de filtración, EDAC reacciona con ácidos carboxílicos (tales como KDO en LOS) para crear un intermediario de éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina (tales como lisinas en las proteínas de membrana exterior tal como PorB), se forma un enlace de amida con liberación de una isourea por producto. Sin embargo, la eficiencia de una reacción mediada por EDAC puede ser incrementada a través de la formación de un intermediario de éster Sulfo-NHS. El éster Sulfo-NHS sobrevive en una solución acuosa más tiempo que el éster activo formado de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De esta forma, se pueden realizar rendimientos más altos de formación de enlaces de amida utilizando este proceso de dos etapas. La conjugación EDAD/NHS se discute en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. El mejoramiento a través de N-hidroxisuccinimida de reacciones acopladas mediadas por carbodiimida soluble en agua. Química analítica 156: 220-222 (1988); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173-176. Preferiblemente se utilizan ampollas de 0.01-5 mg de EDAC/mg en la reacción, más preferiblemente una ampolla de 0.05-1 mg EDAC/mg. La cantidad de EDAC utilizada depende de la cantidad de LOS presente en la muestra la cual a su vez depende del % de desoxicolato (DOC)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

del pH deberá ser mayor de un pH 7.0, preferiblemente mayor o igual a un pH de 7.5 (más preferiblemente un pH por debajo de 9); se deberán mantener condiciones de 1-5%, preferiblemente 2-4%, más preferiblemente alrededor de 3% de sacarosa durante la reacción: NaCl deberá ser minimizado en la reacción de conjugación, preferiblemente por debajo de 0.1M, 0.05M, 0.01M, 0.005M, 0.001M, y más preferiblemente no estar presente para nada. Todas estas características del proceso aseguran que las ampollas permanezcan estables y en solución a lo largo del proceso de conjugación.

10 Aunque LOS puede ser conjugado dentro de las ampollas a proteínas de membrana exterior a través de varias técnicas y químicas, el proceso de conjugación EDAC/NHS es un proceso preferido para la conjugación intra-ampolla. EDAC/NHS es preferido para formaldehído, el cual puede entrelazarse a un alto grado, de esta forma adversamente afecta la calidad de filtración. EDAC reacciona con ácidos carboxílicos para crear un intermediario de éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina, se forma un enlace de amida con liberación de una isourea por producto. Sin embargo, la eficiencia de una reacción mediada por EDAC puede ser incrementada a través de la formación de un Intermediario de éster Sulfo-NHS. El éster Sulfo-NHS sobrevive en una solución acuosa más tiempo que el éster activo formado de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De esta forma, se pueden realizar rendimientos más altos de formación de enlaces de amida utilizando este proceso de dos etapas. La conjugación EDAD/NHS se discute en J. V. Staros,

15
20
25

R. W. Wright y D. M. Swingle. El mejoramiento a través de N-hidroxisuccinimida de reacciones de acoplamiento mediadas por carbodiimida soluble en agua. Química analítica 156: 220-222 (1986); y Bloconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp
5 173-178.

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

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

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

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

5

5. *Proteínas de membrana exterior integrales*

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

10

15

20

25

(NMB0033), HtrA (NMB 0532; WO 99/55872), HimD (NMB 1302), HlsD (NMB 1581), GNA 1870 (NMB 1870), HipA (NMB 1948), NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1853, HtrA, TbpA (NMB 0461) (W092/03467) (ver también bajo proteínas de adquisición de hierro) y

5 LbpA (NMB 1541).

OMP85

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

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

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

20

OstA

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

alternativamente ser incluida en la categoría de toxinas en donde la

25 categoría de toxina se amplía para contener reguladores de toxicidad

así como toxinas.

Composiciones inmunogénicas

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

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

15

Ensayos bactericidas SBA de la invención

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

perteneciente al grupo A-4, B16B6 (B: 2a: P1. 2) perteneciente al complejo ET-37; y H44/76 (B: 15 : P1. 7,16)). SBA es el marcador inmunológico más comúnmente acordado para estimar la eficacia de una vacuna meningocócica (Perkins y otros, J Infect Dis. 1998, 5 177:683-691). Satisfactoriamente SBA puede ser constatado por cualquier método conocido. SBA puede ser llevado a cabo utilizando suero obtenido de modelos de animales (ver ejemplos 17-20), o de sujetos seres humanos.

Un método preferido para conducir SBA con suero de seres humanos es el siguiente. Una muestra de sangre se toma antes de la 10 primera vacunación, dos meses después de la segunda vacunación y un mes después de la tercera vacunación (tres vacunaciones en un año siendo un agenda una vacunación primaria humana típica administrada en los 0, 2, y 4 meses, o 0, 1, y 6 meses). Dichas 15 agendas de vacunación primaria humana pueden ser llevadas a cabo en infantes de menos de 1 año de edad (por ejemplo al mismo tiempo que se llevan a cabo las vacunaciones Hib) o de 2-4 años de edad o los adolescentes también pueden ser vacunados para la prueba SBA con dicha agenda de vacunación primaria. Se puede tomar una 20 segunda muestra de sangre a los 6 a 12 meses después de la primera vacunación y un mes después de una dosis de defensa, si es aplicable.

SBA será satisfactoria para una preparación de antígeno o de ampolla con actividad bactericida homóloga si un mes después de la 25 tercera dosis de vacunación (de la agenda de la vacunación primaria)

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

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

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

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

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

en WO 99/09176 en el Ejemplo 10C. En términos generales, un cultivo de una cepa que va a ser probada se hace crecer (preferiblemente en condiciones de reducción de hierro, a través de la adición de un quelatador de hierro tal como EDDA al medio de crecimiento) en una fase de registro de crecimiento. Esto se puede suspender en un medio con BSA (tal como el medio Hanks con 0.3% de BSA) con el fin de obtener una suspensión de célula trabajando ajustada a aproximadamente 20000 CFU/ml. Se pueden hacer series de mezclas de reacción mezclando series de diluciones dobles del suero que se va a probar (preferiblemente inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos) [por ejemplo en un volumen de 50 µl/cavidad]. Los frascos de reacción deberán ser incubados (por ejemplo 37°C durante 15 minutos) y agitarse (por ejemplo a 210 rpm). La mezcla de reacción final [por ejemplo en un volumen de 100 µl] adicionalmente contiene una fuente de complemento [tal como un volumen final de 25% del suero de conejo bebé preprobado] y se incuba como anteriormente [por ejemplo, 37°C durante 60 minutos]. Se puede utilizar una placa de microtitulación de 96 cavidades de fondo en forma de U de poliestireno estéril para este ensayo. Se puede tomar una alícuota [por ejemplo, 10 µl] de cada cavidad utilizando una pipeta multicanal, y se deja caer dentro de placas de agar Mueller-Hinton (preferiblemente conteniendo 1% de Isovitalex y 1% de Suero de Caballo inactivado por calor), y se incuba (durante por ejemplo 18 horas a 37°C en 5% de CO₂). Preferiblemente, las colonias individuales pueden contarse hasta 80 CFU por alícuota.

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

Ensayos de protección de animales

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

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

protección.

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

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

20 *Ensayo de bloqueo de adhesión*

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

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

5 Composiciones de subunidad

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

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

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

Preparaciones de vesícula de membrana exterior

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

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

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

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

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

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

- 5 Cuando se pretende que LPS sea un antígeno adicional en el OMV, se puede utilizar preferiblemente un protocolo que utiliza una concentración baja de detergente de extracción (por ejemplo desoxicolato o DOC) en el método de preparación OMV para así conservar los altos niveles de enlace a LPS mientras se remueve el
- 10 LPS pobremente enlazado, tóxico. La concentración de DOC utilizada es preferiblemente de 0-0.5% DOC, 0.02-0.4% DOC, 0.04-0.3% DOC más preferiblemente 0.06%-0.2% DOC o 0.08-0.15% DOC más preferiblemente alrededor de o exactamente 0.1% DOC.

- "Secuencia promotora fuerte" se refiere a un elemento de
- 15 control regulador que incrementa la transcripción para un gen que codifica el antígeno de interés. "Expresión de la Regulación ascendente" se refiere a cualesquiera medios para mejorar la expresión de un antígeno de interés, con relación a esa ampolla no modificada (es decir, de existencia natural). Se entiende que la
- 20 cantidad de "regulación ascendente" variará dependiendo del antígeno particular de interés pero no excederá una cantidad que afectará la integridad de la ampolla. La regulación ascendente de un antígeno se refiere a la expresión que es de por lo menos 10% mayor que aquella de la ampolla no modificada. Preferiblemente es de por
- 25 lo menos 50% más alta. Más preferiblemente es de por lo menos

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

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

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

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

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

Los métodos utilizados para llevar a cabo los eventos de

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

10

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

La regulación ascendente de algunos antígenos en una preparación de vesícula de membrana exterior de la invención se logra preferiblemente a través del aislamiento de vesículas de
15 membrana exterior de una cepa de los padres de *Neisseria* que crece bajo condiciones de limitación de hierro. Una baja concentración de hierro en el medio dará como resultado una expresión incrementada de proteínas involucradas en la adquisición de hierro incluyendo
20 *TbpA*, *TbpB*, *LbpA*, *LbpB*, *HpuA*, *HpuB* y P2088. La expresión de estas proteínas es por lo tanto regulada en forma ascendente sin la necesidad de recombinantemente modificar el gen involucrado, por ejemplo a través de la inserción de un promotor más fuerte o insertando una copia adicional del gen. La invención también podría
25 abarcar la regulación ascendente de proteínas de adquisición de

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

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

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

Regulación descendente/Remoción de antígenos inmunodominantes variables y no protectores

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Desintoxicación de LPS

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

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

25 Los métodos adicionales para la desintoxicación de LPS

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

5 Polisacáridos de reacción cruzada

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

25 Esto se puede lograr utilizando cepas de producción de

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Vesículas de membrana exterior combinadas con composiciones de subunidad

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

10
15
20

Composiciones Inmunogénicas específicas de la invención

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

25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Una composición inmunogénica de la invención comprende TbpA(bajo) y por lo menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, proteasa IgA, NspA, HpuA, HpuB, Hap, OMP85, NspA (cuando
15 además está combinado con TbpA (alto)), PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, PilC, Omp28, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, AspA, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB, y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el Inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden TbpA (bajo) y Hsf y
20 LbpA; TbpA (bajo) y OMP85 (opcionalmente con ambos o cualquiera de LbpA y Hap); TbpA (bajo) y LbpA y Hap.

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

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

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende LpbA y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, proteasa IgA, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB y FhaB y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden LbpA y Hsf (opcionalmente con Hap).

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende LpbB y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpA, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, proteasa IgA, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB y FhaB, y FhaB y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS. Las combinaciones preferidas comprenden LbpB y Hsf (opcionalmente con uno o más de OMP85, Hap o FrpA);

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

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

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

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

del grupo que consiste de LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0984, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, proteasa IgA, AspA, NadA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, OMP85, NspA, PilC, 5 Omp26, NMB0315, NMB0995, NMBI 119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB, y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el Inmunotipo L3 de LPS.

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

Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el Inmunotipo L3 de LPS y por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, 20 HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0984, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, proteasa IgA, AspA, NadA, FhaB, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB.

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

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

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

como se describió anteriormente).

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

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

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

15 Combinaciones adicionales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los conjugados también pueden ser preparados a través de métodos de animación reductiva directa como se describe en US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros métodos se
15 describen en EP-0-161-188, EP-208375 Y EP-0-477508. Un método adicional involucra el acoplamiento de un polisacárido activado de bromuro de cianógeno derivatizado con hidracida de ácido alípico (ADH) a la proteína portadora a través de condensación de carbodiimida (Chu C. y otros Infect. Immunity, 1983 245 258).
20 Cuando los oligosacáridos están incluidos, se prefiere que estén conjugados.

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

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

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

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

Preparaciones de ampollas *Moraxella catarrhalis*

10 Las composiciones de la invención además pueden comprender preparaciones OMV derivadas de *Moraxella catarrhalis*. Las preparaciones OMV diseñadas pueden derivarse de *Moraxella catarrhalis* como se describe en WO 01/09350. Uno o más de los siguientes genes (codificando los antígenos protectores) son
15 preferidos para la regulación ascendente: OMP108 (WO 97/41731 & WO 96/34960), HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85(PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977.2), lipo10 (GB 9918208.1), lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P8 (PCT/EP99/03038), ompCD, CopB (Helminen ME, y otros (1993) Infect. Immun. 61: 2003-2010), D15 (PCT/EP99/03822), Omp1A1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), LbpA y LbpB (WO 98/55606), TbpA y TbpB (WO 97/13785 & WO 97/32980), OmpE, UspA1 y UspA2 (WO 93/03761), y Omp21. También son preferidos
20 como genes que pueden ser heterológicamente introducidos dentro
25 otras bacterias Gram-negativas.

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la regulación descendente: CopB, OMP108, OmpB1, TbpA, TbpB, LbpA, y LbpB.

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

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

Preparaciones de ampollas *Haemophilus influenzae*

10 Las composiciones inmunogénicas de la Invención además comprenden preparaciones OMV derivadas de *Haemophilus influenzae*. Las preparaciones OMV diseñadas pueden derivarse de *Haemophilus influenzae* como se describe en WO 01/09350. Uno o más de los siguientes genes (codificando los antígenos protectores)
15 son preferidos para la regulación ascendente: D15 (WO 94/12641), P6 (EP 281673), TbpA (W096/40929; W095/13370), TbpB (W096/40929; W095/13370), P2, P5 (WO 94/26304), OMP26 (WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hsf, Hap, Hln47, y Hif (todos los genes en este gen operador deberán ser regulados de
20 manera ascendente con el fin de regular de manera ascendente plln). También son preferidos como genes que pueden ser heterológicamente introducidos en otras bacterias Gram-negativas.

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

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

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

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

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

25 Los antígenos del virus de Influenza preferidos incluyen virus

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

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

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden
 10 incluir proteínas de *Moraxella catarrhalis* que incluyen TbpA
 (W097/13785; W099/52947), TbpB (W097/13785; W099/52947;
 Mathers y otros FEMS Immunol Med Microbiol 1997 19; 231-236;
 Myers y otros Infect Immun 1998 66; 4183-4192), LbpA, LbpB (Du y
 otros Infect Immun 1998 66; 3658-3665), UspA1, UspA2 (Aebi y otros
 15 Infect Immun. 1997 65; 4367-4377), OMP106 (US6214981), receptor
 dependiente de Ton-B (WO00/78968), CopB (Sethi y otros, Infect.
 Immun. 1997 65; 3666-3671), y receptor de HasR (WO00/78968); las
 proteínas de *Haemophilus influenzae* incluyen HMW (St Geme y
 otros, Infect Immun 1998 66; 364-368), Hia (St Geme y otros J.
 20 Bacteriol. 2000 182; 6005-6013), Tbp1 (W096/40929; W095/13370),
 Tbp2 (W096/40929; W095/13370; Gray-Owen y otros Infect Immun
 1995 63; 1201-1210), LbpA, LbpB (Schryvers y otros 1989,29: 121-
 130), HasR, receptor dependiente de TonB (Fleishmann y otros
 Science 1995 269; 496-512), proteína de unión a hemoglobina, HhuA
 25 (Cope y otros Infect Immun 2000 68; 4092-4101), HgpA (Maciver y

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

Formulaciones de vacuna

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

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

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

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

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

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

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

La preparación de la vacuna de la presente invención puede

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

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

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

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

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

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

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

Polinucleótidos de la invención

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

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

Otro aspecto de la invención se refiere a una formulación inmunológica/vacuna que comprende uno o más polinucleótidos.
15 Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica, ver por ejemplo, Wolff y otros, Science (1990) 247: 1485-8.

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

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

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

5 Aspectos adicionales de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

10

Vacunas de célula Entera Fantasma o Aniquiladas

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

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

5

Anticuerpos e Inmunización pasiva

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 Los métodos para hacer anticuerpos monoclonales son bien

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

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

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

15

Método de Aplicación Industrial de la Invención

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

25

EJEMPLO 1

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

5

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

10

EJEMPLO 2

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

15

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

20

25

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

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

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

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

Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

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

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

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

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

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

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

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

fragmento de PCR se purificó con un Equipo High Pure (Boehringer Mannheim, Alemania), y se clonó directamente en un vector pGemT (Promega, EUA). Este plásmido se sometió a mutagénesis PCR de círculo (Jones & Winstofer (1992)) con el fin de (i) insertar los sitios
 5 de restricción adecuados permitiendo la clonación de un casete promotor *CmR/PorA* y (ii) eliminar 209bp de la secuencia de flaqueo 5' de *tbpB* y la secuencia de codificación *tbpB*. La PCR de círculo se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos BAD 18 (5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') y el BAD
 10 19 (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G-3') conteniendo los sitios de restricción adecuados *XmaI*, *BglII* y *Soy* (subrayados). El casete promotor *Cmr/PorA* se amplificó a partir del plásmido pUC D15/Imp85 previamente descrito, utilizando los iniciadores BAD 21
 15 (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') y BAD20 (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') conteniendo los sitios de restricción adecuados *XmaI*, *SpeI*, *BglII* y *Soy* (subrayados). Este fragmento de PCR se clonó en el plásmido PCR de círculo. Este plásmido se utilizará para
 20 transformar las cepas B [*cps*-] y [*cps-porA*] del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. La integración a través del cruzamiento doble en la región en corriente ascendente de *tbpA* dirigirá la inserción del promotor *porA* directamente en corriente ascendente del ATG *tbpA*.

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

5

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

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

25

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

5 colocaron en placas durante la noche en agar GC conteniendo 200 µg/ml de canamicina, diluido a $DO_{660}=0.1$ en medio líquido GC 10 mM de $MgCl_2$, y se incubaron durante 6 horas a 37°C bajo agitación vigorosa con 10 µg de ADN genómico restringido *DraIII*. La *Neisseria meningitidis* recombinante resultante de un cruzamiento doble sobre

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

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

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

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

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

5

El propósito del experimento fue regular en forma ascendente la expresión de TbpA y NspA simultáneamente en la misma cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*. La producción de TbpA se reguló en forma ascendente reemplazando su región promotora endógena a través del promotor *porA* fuerte (reemplazo del promotor). La expresión de NspA se reguló de forma ascendente a través de la inserción (recombinación homóloga) de una segunda copia del gen correspondiente en el sitio *porA* (entrega del gen). Ambas cepas individuales han sido descritas en una patente separada WO 15 01/09350. Los marcadores de selección utilizados en ambas estrategias (Cm^R o Kan^R) permitieron la combinación de ambas integraciones dentro del mismo cromosoma. El ADN genómico total fue extraído de la cepa *NmB cps-/TbpA+/PorA+* recombinante a través del protocolo tip 500-G de Qiagen Genomic. Se restringieron 20 10 μg de ADN o/n con la enzima de restricción *AclI* y se utilizaron para transformar el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* a través del protocolo de transformación clásico. Las células utilizadas para la transformación fueron cualquier *NmB cps-/NspA+/PorA-* recombinante. Estas se colocaron en placas durante la noche en agar 25 GC conteniendo 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de canamicina, diluido a $\text{DO}_{650}=0.1$ en

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

20

EJEMPLO 8

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

25

El propósito del experimento fue regular en forma ascendente

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

El ADN genómico total fue extraído de la cepa *NmB cps-/D15/Omp85/PorA+* recombinante a través del protocolo tip 500-G de Qiagen Genomic. Se restringieron 10 μg de ADN o/n con la enzima de restricción *AatII* y se utilizaron para transformar el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* a través del protocolo de transformación clásico. Las células utilizadas para la transformación fueron cualquier *NmB cps-/NspA+/PorA-* recombinantes. Estas se colocaron en placas o/n sobre agar GC conteniendo 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de canamicina, diluido a $\text{DO}_{650}=0.1$ en medio líquido GC 10 mM de MgCl_2 , y se incubaron durante 6 horas a 37°C bajo agitación vigorosa con 10 μg de ADN genómico restringido *AatII*. La *Neisseria meningitidis* recombinante resultante de un cruzamiento doble a través del evento (clasificación PCR) se seleccionó en medio GC conteniendo 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de canamicina y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol y se analizó para la

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

EJEMPLO 7

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

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

de la proteína y una bisagra (cuello), el Dominio 4, comprendiendo los residuos 535 del término C, se pronostica que codifica estructuras de cadena beta probablemente dentro de la estructura de tipo barril y que van a ser ancladas dentro de la membrana exterior (Henderson y otros (1998), Trends Microbiol. 6: 370-378 ; Hoiczky y otros, (2000), EMBO 22: 5989-5999). Ya que los dominios 2 y 3 probablemente van a estar expuestos en la superficie, están bien conservados (más de 80% en todas cepas probadas, como se describe en Pizza et al. (2000), Science 287: 1818-1820), representan interesantes candidatos de vacuna. Para ese propósito, el dominio 2 (referido como un dominio pasajero Hsf) y el dominio 2 + 3 (referido como un cuello Hsf + dominio de enrollado-espiral) fueron expresados en y purificados de *E. coli*. Los fragmentos de ADN que codifican los aminoácidos 52-473 (Hsf pasajero) y 52-534 (Hsf n+cc) fueron amplificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos que agregan los sitios de restricción *RcaI* terminal (iniciador hacia delante) y *XhoI* (iniciador en reversa). Los amplicones purificados fueron digeridos con *RcaI/XhoI* en las condiciones recomendadas por el proveedor, y fueron subsecuentemente clonados en los sitios *NcoI* (compatible con *real*) / *XhoI* del vector de expresión de *E. coli* pET24d (Novagen, Inc. Madison WI). Los plásmidos recombinantes fueron seleccionados y utilizados para preparar plásmidos recombinantes purificados. Para el estudio de expresión, estos vectores (pET-Hsf pas & pET-Hsf ncc) fueron introducidos dentro de la cepa B121DE3 de *Escherichia coli*

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

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

20

EJEMPLO 8

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

25

El análisis de computadora de la proteína de tipo Hap de

Neisseria meningitidis reveló, por lo menos tres dominios estructurales. Considerando que la secuencia Hap de la cepa H44/78 como una referencia, el Dominio 1, que comprende los aminoácidos 1-42, codifica un péptido de señal dependiente de sec característico de la familia auto-transportadora, el Dominio 2, comprendiendo los aminoácidos 43 a 950, codifica el dominio pasajero probablemente para estar expuesto en la superficie y accesible al sistema inmune, el Dominio 3, comprendiendo los 951 residuos del término C (1457), se pronostica que codifica estructuras de cadena beta probablemente dentro de la estructura de tipo barril y que van a ser ancladas dentro de la membrana exterior. Ya que el dominio 2 probablemente va a estar expuesto en la superficie, está bien conservados (más de 80% en todas cepas probadas) y podría ser producido como antígenos de subunidad en *E. coli*, representa interesantes candidatos de vacuna. Ya que los dominios 2 y 3 probablemente van a estar expuestos en la superficie, están bien conservados (más de 80% en todas cepas probadas, como se describe en Pizza et al. (2000), Science 287: 1816-1820), representan interesantes candidatos de vacuna. Para ese propósito, el dominio 2 (referido como un dominio pasajero Hap fue expresado en y purificado a partir de *E. coli*). Un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 43-950 (Hap pasajero) se amplificó mediante PCR utilizando oligonucleótidos que agregan los sitios de restricción *NcoI* terminal (iniciador hacia delante) y *XhoI* (iniciador en reversa). Los amplicones purificados fueron digeridos con *NcoI/XhoI* en las condiciones recomendadas por el proveedor, y

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

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

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

Purificación del Hap pasajero:

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

Prensa Francesa

(Tris 50 mM/EDTA 5 mM, pH 8.0)

10

30'a 10000 rpm (JA10)

solubilizar pella en Pi 20 mM/urea 8M, pH 7.0

1H agitación a temperatura ambiente

15

30' a 10000 rpm (JA10)

SP-Sepharose-XL

20

Pi 20mM/Urea 8M; elución +/-50 mM NaCl

Quelatación Sepharose -FF-Cu⁺⁺

Pi 20 mM/NaCl 0.5 M/Urea 8M; elución +/-100 mM imidazol

25

Díálisis

(PBS pH 6.8/arginina 0.5 M)

filtración estéril

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

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

5

EJEMPLO 9

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

Neisseria meningitidis codifica dos proteínas RTX, referidas
 10 como FrpA y FrpC secretadas dependiendo de la limitación de hierro
 (Thompson y otros, (1993) J. Bacteriol. 175: 811-818; Thompson y
 otros, (1993) Infect. Immun. 61: 2906-2911). La familia de proteína
 RTX (Repetición de toxina) tiene en común series de 9 aminoácidos
 repetidos cerca de su término C con los consensos: Leu Xaa Gly Gly
 15 Xaa Gly (Asn/Asp) AspXaa. (LXGGXGN/DX). Las repeticiones en *E.*
coli HlyA se cree que son el sitio de la unión de Ca^{2+} . Como se
 representa en la Figura 4, las proteínas FrpA y FrpC
 meningocócicas, según caracterizadas en la cepa FAM20, comparten
 una similitud de aminoácido extensiva en sus regiones central y C-
 20 terminal pero similitud muy limitada (si hay alguna) en el término N.
 Además, la región conservada entre FrpA y FrpC exhiben algo de
 polimorfismo debido a la repetición (13 veces en FrpA y 43 veces en
 FrpC) de un motivo de aminoácido 9. Para evaluar el potencial de la
 vacuna de FrpA y FrpC, se reprodujeron recombinantemente en
 25 regiones de proteína de *E. coli* conservadas entre FrpA y FrpC. Para

ese propósito, un segmento de ADN cubriendo los aminoácidos 277 a 1007 (con respecto a la secuencia de péptido FAM20 de *N. meningitidis*) se amplificaron mediante PCR a partir del genoma H44/76 del serogrupo B de *N. meningitidis* utilizando el iniciador

5 hacia delante FrpA-19 (5'-CTCGAGACCATGGGCAAA TATCATGTCTACGACCCCCTCGC-3') y el iniciador en reversa FrpA-18 (3'-GTG CATAGTGTCTAGAGTTTTTGTGACGTCGTAATTATAGACC-3'). Tres amplicones de aproximadamente 1530 bp respectivamente (3 repeticiones), aproximadamente 2130 bp (13 repeticiones) y 2732

10 bp (23 repeticiones) se obtuvieron y se digirieron con endonucleasas de restricción *NcoI* y *SaII*. Estos fragmentos después fueron insertados en los sitios *NcoI/XhoI* (compatible con *SaII*) de pET24d y plásmidos recombinantes (pET-Frp3, pET-Frp13 y pET-Frp23 respectivamente) se seleccionaron y se utilizaron para transformar

15 células BL21DE3 de *E. coli*. Como se representa en la Figura 5, los tres dominios conservados FrpA/C recombinantes producidos de construcciones dependen de la inducción. Además, la incrementar el número de repeticiones se incrementa la solubilidad de la proteína recombinante, según determinado por el análisis de fragmentación de

20 célula (datos no mostrados).

Purificación del dominio conservado FrpA/C conteniendo 23 repeticiones del nonapéptido LXGGXGC/DDX (911 aa en total): 3.5

litros de *E. coli* B121DE3 [pET- Frp23] se cultivaron y se indujeron

25 durante 4 horas a través de la adición de 2 mM de IPTG cuando se

alcanzó un OD de 0.6. La célula se cosechó a través de centrifugación y la pella correspondiente se desestabilizó con presión, se clarificó a través de centrifugación y el sobrenadante de cultivo correspondiente se cargó en una columna de afinidad de ión de metal Ni²⁺ (Ni-NTA-agarosa, Qiagen GmbH). Se utilizó Imdazol () para la elución y finalmente se removi6 a través de diálisis extensiva contra 10 mM de fosfato de Na pH 6.8, 150 mM de NaCl.

EJEMPLO 10

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

Clonación de un FhaB truncado de *N. meningitidis*

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

82(1):88-92) utilizando técnicas de biología molecular estándar (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Segunda Edición, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). La secuencia de ADN del fragmento FhaB clonado se determinó

5 utilizando el equipo de Secuenciación Big Dye Cycle (Perkin-Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM (ver Figura 1). El plásmido pMG-FhaB recombinante (1 µg) después fue sometido a amplificación de ADN de Reacción de Cadena de Polimerasa utilizando los

Iniciadores	específicos	FhaB
-------------	-------------	------

10 (XJKP035'AATGGAATACATATGAATAAAGGTTTACATCGCATTATCTTT AG3' y XJKP57025'GGGGCCACTCGAGGTTTTTCGCTACTTGGAGCTGTTTCAGATAGG3'). Un fragmento de ADN de 4214 bp se obtuvo, se digirió a través de endonucleasas de restricción *NdeI/XhoI* y se insertó dentro de los sitios correspondientes del vector de

15 expresión/clonación pET-24b (Novagen) usando técnicas de biología molecular (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Segunda Edición, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). La secuenciación confirmatoria del pET-24b recombinante conteniendo FhaB truncado (pET23b/FhaB2/3) se llevó

20 a cabo utilizando el equipo Big Dyes (Applied biosystems) y el análisis en un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el proveedor. La secuencia de nucleótido resultante se presenta en la Figura 6.

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

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

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

Inmunización de ratones con FhaB2/3His recombinante

La proteína FhaB2/3/His6 recombinante parcialmente purificada expresada en *E. coli* se inyectó tres veces en ratones Balb/C en los días 0, 14, y 28 (10 animales/grupo). Los animales se inyectaron mediante ruta subcutánea con alrededor de 5 μg de AlPO_4 , o formulado en emulsión SBAS2 (emulsión de SBAS2 conteniendo 5 μg de MPL y 5 μg de QS21 por dosis). Un grupo de control negativo consistiendo de ratones inmunizados con la emulsión SBAS2 solamente también se agregó al experimento. Los ratones se sangraron en el día 28 (15 días Post II) y el día 35 (8 días Post III) con el fin de detectar anticuerpos anti-FhaB específicos. Los anticuerpos anti-FhaB específicos se midieron en suero combinado

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

EJEMPLO 11

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

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

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

meningocóccas (la colonia 2.10E5 que forma unidades (CFU) del derivado NmA8013) se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un medio compuesto de 400 µl de RPMI, 50 µl de suero de bovino fetal y 50 µl de suero que va ser probado para las propiedades de bloqueo de adhesión. Esta mezcla después se colocó en una cavidad conteniendo monocapas confluentes de células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVECs) cuyo medio de cultivo has sido previamente removido. Las células de bacteria y de HUVEC fueron incubadas durante 4 horas a 37°C, bajo CO2 al 5%. Las monocapas de células después se lavaron tres veces con suero RMPI fresco y subsecuentemente se eliminaron de la placa. CFU asociado con las células HUVEC después fueron determinadas como dilución serial y se colocaron en placas del llato de célula sobre placas GC. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C para permitir la recuperación y crecimiento de meningococo asociado con célula.

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

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

antígenos de vacuna interesantes.

EJEMPLO 12

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

Han sido evaluados varios OMVs recombinantes en ratones Balb/C en su efecto protector después de un ataque letal. Este modelo de inmunización activo involucra la inyección intraperitoneal de meningococos de varias cepas (suspendidas en medio TSB reducido en hierro) en ratones Balb/C y OF1 adultos (de 6 a 8 semanas de edad), después de series de inmunizaciones a través de la ruta subcutánea. La dextrana de hierro, utilizada como una fuente de hierro externa parece ser necesaria para mantener la bacteriemia e inducir la mortalidad en el animal infectado. Aunque este modelo IP en ratones ha mostrado ser efectivo para evaluar la virulencia, la protección inmune y el papel del hierro en la infección, no incorporan la fase de transporte faringeo, la cual precede la bacteriemia y la meningitis en humanos. Este modelo ha sido utilizado para clasificar nuestros varios candidatos OMV que sobre expresan NspA, TbpA, o Hsf. En los siguientes experimentos, se inmunizaron ratones Balb/C (endogámicos) u OF 1 (no congénitos) tres veces en los días 0, 14, y 28 a través de la ruta subcutánea con 3 (PVOON049) a 5 µg (experimentos PV00N035 y PV00N043) de rec. OMV sobre- expresando Hsf, NspA o TbpA formulado en $Al(OH)_3$ (100 µg Al

(OH)₃/animal) (PV00N035 y PV00N043) o en A1 PO₄ (100 µg A1 PO₄/animal). Después, los animales se sangraron en los días 28 (día 14 después de II) y día 35 (día 7 después de III) para la evaluación Ab específica. En el día 35, 10 mg de dextrana de hierro se inyectó intraperitonealmente una hora antes del ataque. Los ataques se hicieron con las cepas H44/76 (B:15:P1. 7,16) o CU- 385 (B:4:P1. 19,15), con alrededor de 1.10⁸ de CFU/animal (ver el cuadro de resultados para la dosis de ataque exactas). La cepa heteróloga hecha con la cepa CU-385 es más estricta que cuando se utiliza la cepa homóloga. Las mortalidades se registraron a partir de los días 1 a 5. El cuadro 1 a continuación ilustra que cuando se compara con OMV, porA(-) y con OMV TbpA (+) en una extensión más corta, ya existe una mejor protección observada con OMV TbpA (+) y 3/5 para porA (-) y 9/10 y 3/5 para porA(+)), con OMV NspA (+) (4/10 y 4/5) y con OMV Hsf (+) (3/10, 2/10 y 3/5). Esta es la observación global que se puede hacer en estos tres experimentos. Estos datos soportan que los antígenos TbpA, Hsf y HspA, expresados en la superficie de la ampolla, sean de interés para una vacuna *menB* futura.

20

CUADRO 1

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

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

25

OMVs (Ampollas)

5	OMVs rec (antecedentes H44/78 = porA P1.17, 18)	Tasa de supervivencia (protección del ratón activa en el día)			Abs Inmuno específicos a través de Elisa Media – PV00N049 solo
		PV00N035 en ratones OF1	PB00N043 en ratones Balb/C	PV00N049 en ratones OF1	
		Cepa de ataque (+			
		H44/78 (B:15:P1.7, 1.27	H44/78 (B:15:P1.7, 1.0	H44/78 (B:15:P1.7, 1.1	
	OMV porA(-)	1/10	0/10	1/5	/
	OMV porA(+)	2/10	9/10	4/5	/
10	OMV TbpA porA(+)	NT	9/10	3/5	<
	OMV TbpA porA(-)	NT	1/10	3/5	<
	OMV NapA porA(+)	1/10	4/10	4/5	155 – (<
	OMV Hsf porA(-)	3/10	2/10	3/5	7802-(5498)
	OMV Hsf porA(+)	NT	9/9	NT	/
	Sin antígeno	0/10	0/10	1/5	/

15 NT: No probado

EJEMPLO 13

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

20

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

25

de la ruta subcutánea.

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

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

Después, los animales se sangraron en los días 28 (día 14 después de II) y día 35 (día 7 después de III) para la evaluación Ab específica, mientras se atacaron en el día 35. En el día del ataque se inyectaron 10 mg de dextrana de hierro Intraperitonealmente una hora antes del ataque. Los ataques se hicieron con las cepas CU-385 (B:4:P1.19,15), las cuales son heterólogas en este caso, clertamente, la secuencia de los antígenos que vienen de H44/78 (B:15:p1.7,18), excepto para TbpA para el cual la secuencia viene de la cepa B16B8 (B:2a:P1.2).

Los resultados ilustrados en el cuadro 2 indican que FrpC,

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

10

15

20

25

CUADRO 2

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

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

Antígenos de Sub-unidad

10

Rec de antígenos de sub-unidad (de la secuencia Ag H44/76)	Tasa de supervivencia Modelo de protección de ratón activo	Abs Inmunespecíficos a través de ELISA Media – (GMT)
	PV00N050 (en ratones OF1)	
	Cepa atacada (+dosis)	
	CU-385 (B:4:P1.19,15) 1.4 10e7	
FrpC Ca2++ tratado	3/5	31477 – (27068)
FHAB 2/3 replegado	2/5	98200 – (73220)
FHAB 2/3 no replegado	3/5	55939 – (35347)
Hap N-ter	4/5	9980 – (12811)
recTbpA en SBAS4	3/5	875 – (520)
SBAS4	1/5	/

20

EJEMPLO 14

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

25

Diferentes OMVs recombinantes disponibles (OMVs porA

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

15

EJEMPLO 15

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

20 SDS-PAGE teñido con Coomassie azul

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

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

EJEMPLO 16

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

Se inmunizaron grupos de 20 ratones tres veces con OMV a través de la ruta Intramuscular en los días 0, 21 y 28. Cada inoculación fue hecha de 5 µg (contenido de proteína) de OMVs formulados en AlPO₄ con MPL. Los OMVs se derivaron de la cepa H44/76 de *N. meningitidis*, diseñada para que los polisacáridos capsulares y PorA fueran regulados de manera descendente. Se hizo una comparación de OMVs en los cuales Hsf, TbpA, ambos Hsf y TbpA o ninguno fue regulado de manera ascendente. En el día 41, las muestras sanguíneas se tomaron para análisis a través de ELISA o a través del ensayo bactericida del suero.

ELISA para detectar anticuerpos contra Hsf

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

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

20		Punto medio de concentración (en el suero sondeado)
	g1, ampollas TbpA-Hsf, IM	15471
	g2, ampollas TbpA, IM	15.41
	g3, ampollas HSF, IM	14508
	g4, ampollas CPS(-)PorA(-), IM	-
25	g5, MPL/AlPO4, IM	-

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

10

EJEMPLO 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EJEMPLO 18

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

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

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

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

SBA hecho en el suero reunido de ratones Inmunizados con	Concentración de SBA
Ampollas TbpA-Hsf	774
Ampollas TbpA	200
Ampollas Hsf	50
Ampollas CPS(-) PorA(-)	50
Mix anti-TbpA + suero anti-Hsf	1182

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

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

EJEMPLO 19

5 Proteínas Hsf truncadas pueden combinarse sinérgicamente con TbpA

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

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

anteriormente.

Resultados

5		Concentraciones Bactericida del Suero	
		H44/76	CU385
10	Grupo		
	Mc58 PorA + slaD+	25800	25800
	Mc58 PorA – slaD- Hsf	1530	800
	Mc58 PorA – slaD- Tr1Hsf	1015	1360
	Mc58 PorA – slaD- Tr2Hsf	50	50
	Control negativo	50	50
	TbpA + MC58 PorA+ slaD+	25800	24182
	TbpA + MC58 PorA- slaD- Hsf	2595	1438
	TbpA + MC58 PorA- slaD- Tr1Hsf	4383	2891
	TbpA + MC58 PorA- slaD- Tr2Hsf	1588	742
	TbpA + control negativo	778	532

15 Los resultados mostrados en el cuadro anterior revelan que la primera truncación (Tr1Hsf) provoca una respuesta inmune que es capaz de combinarse con antisuero contra TbpA para producir una actividad bactericida de suero más grande que cuando se utiliza Hsf de longitud completa. Sin embargo, la extensión de la truncación es

20 importante y la truncación producida en Tr2 tiene un efecto de deterioro comparado con el Hsf de longitud completa. La actividad bactericida mejorada de Tr1Hsf ha sido vista contra ambas cepas utilizadas.

EJEMPLO 20

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

5 La cepa H44/76 de *N. meningitidis* en la cual PorA y los
polisacáridos se regulador en forma descendente como se describió
anteriormente, se utilizaron como la cepa base para regular de forma
ascendente TbpA y Hsf, LbpB, D15, PilQ y NspA utilizando el
procedimiento descrito anteriormente. Las vesículas de membrana
10 exterior se prepararon de cada cepa como se describió
anteriormente. FHAb, FrpC, FrpA/C y Hap se prepararon utilizando
técnicas descritas aquí anteriormente y conocidas en la técnica
(como se describe en PCT/EP98/02766, W092/01460 y W098/02547).

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

Resultados

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

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

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

Concentración Bactericida del suero		
Mezcla de antisuero	H44/76	CU385
anti-TbpA- Hsf y suero autoinmune	5378	2141
anti-TbpA- Hsf y suero anti-FHA	5260	2583
anti-TbpA- Hsf y suero anti-Hap	4577	5150
anti-TbpA- Hsf y suero anti-FrpA/C	5034	4358
anti-TbpA- Hsf y suero anti-LbpB	5400	4834
anti-TbpA- Hsf y suero anti-D15	4823	4857
anti-TbpA- Hsf y suero anti-PIIQ	4708	2242
anti-TbpA- Hsf y suero anti-NspA	4738	2518
anti-TbpA- Hsf y suero anti-FrpC	6082	2300

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

5

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

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

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

25

Resultados

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

5

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

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

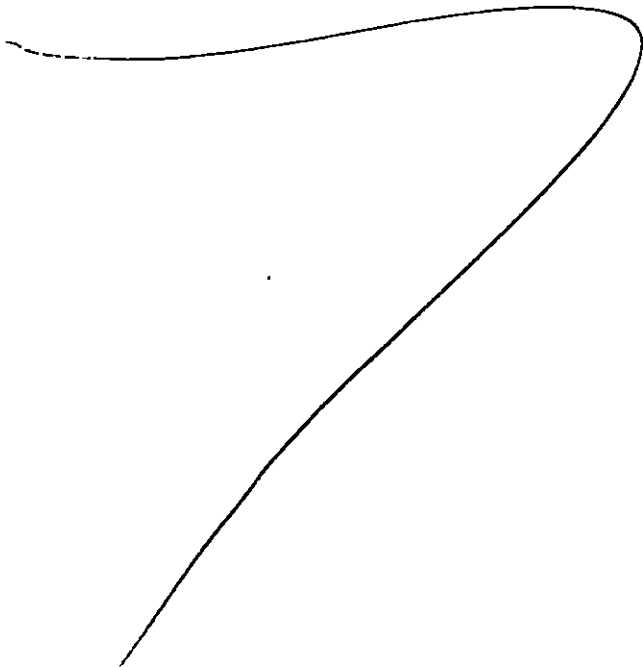
10

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

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

20 aniquilación de la cepa homóloga.

25



REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende dos o más antígenos diferentes en donde los antígenos se seleccionan de por lo
5 menos dos de las siguientes categorías:

- a) por lo menos una adhesina Neisserial;
- b) por lo menos una autotransportadora Neisserial;
- c) por lo menos una toxina Neisserial;
- d) por lo menos una proteína de adquisición de Fe
10 Neisserial;
- e) por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial, preferiblemente proteína de membrana exterior.

2. La composición inmunogénica de acuerdo con la
15 reivindicación 1, en donde los antígenos se seleccionan de por lo menos dos de las siguientes categorías:

- a) por lo menos una adhesina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, PilC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119 y NadA;
- 20 b) por lo menos una autotransportadora Neisserial seleccionada del grupo que consiste de Hsf, Hap, proteasa IgA, AspA y NadA;
- c) por lo menos una toxina Neisserial seleccionada del grupo que consiste de FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT, y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS o el inmunotipo L2 de LPS;
- 25 d) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial

seleccionada del grupo que consiste de TbpA alta, TbpA baja, TbpB alta, TbpB baja, LbpA, LbpB, P2086, HpuA, HpuB, Lipo28, Sibp, FbpA, BfrA, BfrB, Bcp, NMB0964 y NMB0293; o

e) por lo menos una proteína asociada con la membrana
5 Neisseria seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, FhaC, NspA, TbpA (alta), TbpA (baja), LbpA, HpuB, TspA, TspB, TdfH, PorB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, MltA, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA y PldA.

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

4. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende por lo menos 2 antígenos seleccionados del grupo que consiste de: FhaB, NspA, el dominio pasajero de Hsf, el dominio pasajero de Hap, el dominio de
15 superficie expuesta de OMP85, FrpA, FrpC, TbpB, LbpB, PldA, PilC, Lipo28 y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

5. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una preparación de vesícula de
20 membrana exterior, en donde los antígenos han sido regulados en forma ascendente (preferiblemente recombinantemente) en la vesícula de membrana exterior.

6. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende por lo menos dos antígenos
25 seleccionados de la siguiente lista los cuales han sido regulados en

forma ascendente en la vesícula de membrana exterior: NspA, Hsf, Hap, OMP85, AspA, HpuA, HpuB, TspA, TspB, FhaC, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpA, TbpB, LbpB, PilQ, NM-ADPRT, P2086, TdfH, PorB, MafA, MafB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, 5 MitA y PldA; y opcionalmente comprende cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

7. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una composición de subunidad que tiene uno o más de los antígenos, y una preparación de vesícula 10 de membrana exterior que tiene por lo menos un antígeno el cual ha sido regulado en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.

8. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una composición de subunidad y 15 una preparación de vesícula de membrana exterior, en donde la composición de subunidad comprende por lo menos un antígeno seleccionado de la siguiente lista: FhaB, NspA, el dominio pasajero de Hsf, el dominio pasajero de Hap, el dominio de superficie expuesta de OMP85, FrpA, FrpC, TbpB, LbpB, PilC, Lipo28 y la 20 preparación de la vesícula de membrana exterior que tiene por lo menos un antígeno seleccionado de la siguiente lista, el cual ha sido recombinantemente regulado en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior: NspA, Hsf, Hap, OMP85, AspA, HpuA, HpuB, TspA, TspB, FhaC, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpA, TbpB, LbpB, PilQ, 25 NM-ADPRT, P2086, TdfH, PorB, MafA, MafB, HimD, HisD, GNA1870,

OstA, HlpA, MltA y PIDA ; y opcionalmente comprende cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS, preferiblemente dentro de la preparación de la vesícula de membrana exterior.

5 9. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 5-8, que comprende por lo menos dos diferentes preparaciones de vesícula de membrana exterior de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.

10 10. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la preparación de la vesícula de membrana exterior es del inmunotipo L2 y una preparación de la vesícula de membrana exterior es del Inmunotipo L3.

15 11. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 en donde se seleccionan Hsf y TbpA (alto).

 12. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-2 o 5-11, en donde se seleccionan Hsf o TbpA(bajo).

20 13. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde además se seleccionan uno o más antígenos adicionales de una lista que consiste de Hap, LbpB, OMP 85 y FrpA.

25 14. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 11-13, en donde además se selecciona el inmunotipo L2 de LPS.

15. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 11-14, en donde además se selecciona el inmunotipo L3 de LPS.

16. La composición inmunogénica de acuerdo con las
5 reivindicaciones 1-15, en donde FhaB se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp28, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, Hsf, LbpB, FrpA, FrpC, FrpA/C, NadA, OMP85, PldA, LbpA, TbpA (bajo), TbpA (alto),
10 TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, Hap, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, NspA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

15 17. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-16, en donde NspA se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp28, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, Hsf, LbpB, FrpA, FrpC, FrpA/C, NadA, OMP85, PldA, LbpA, TbpA (bajo), TbpA (alto),
20 TbpB (bajo), TbpB(alto), HpuA, HpuB, Hap, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y
25 el inmunotipo L3 de LPS.

18. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-17, en donde NadA se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, Hsf, LbpB, FrpA, FrpC, FrpA/C, OMP85, PldA, LbpA, TbpA (bajo), TbpA(alto), TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, Hap, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA, TspB, P2088, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

19. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-18, en donde TbpA(bajo) se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, Hsf, LbpB, FrpA, FrpC, FrpA/C, OMP85, PldA, LbpA, TbpA (alto), TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, Hap, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del Inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

20. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-19, en donde TbpA(alto) se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que

consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, Hsf, LbpB, FrpA, FrpC, FrpA/C, OMP85, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, Hap, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del Inmunotipo L2 de LPS y el Inmunotipo L3 de LPS.

21. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-20, en donde LbpB se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, Hsf, FrpA, FrpC, FrpA/C, OMP85, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, Hap, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

22. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-21, en donde OMP85 se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, Hsf, FrpA, FrpC, FrpA/C, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, Hap, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA,

HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

23. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 5 reivindicaciones 1-22, en donde Hap se selecciona junto con por lo
 menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de:
 PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124,
 NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, Hsf, FrpA, FrpC,
 FrpA/C, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa
 10 IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HlsD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA,
 TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315,
 NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del
 inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

24. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 15 reivindicaciones 1-23, en donde Hsf se selecciona junto con por lo
 menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de:
 PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124,
 NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, FrpA, FrpC,
 FrpA/C, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa
 20 IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HlsD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA,
 TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315,
 NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del
 inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

25. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 25 reivindicaciones 1-24, en donde FrpA se selecciona junto con por lo

menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, FrpC, FrpA/C, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

26. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-25, en donde FrpC se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS y el inmunotipo L3 de LPS.

27. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-26, en donde el inmunotipo L2 de LPS se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA,

HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT, VapD y el inmunotipo L3 de LPS.

28. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 5 reivindicaciones 1-27, en donde el inmunotipo L3 de LPS se
 selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional
 seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26,
 NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB
 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA,
 10 HpuB, proteasa IgA, AspA, PilQ, MltA, HlmD, HlsD, GNA1870, OstA,
 HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293,
 NMB0315, NMB 1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT y VapD.

29. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 reivindicaciones 1-28, en donde PilQ se selecciona junto con por lo
 15 menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de:
 PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124,
 NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB
 (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, MltA, HlmD,
 HlsD, GNA1870, OstA, HlpA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp,
 20 NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT y
 VapD.

30. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 reivindicaciones 1-29, en donde HlpA se selecciona junto con por lo
 menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de:
 25 PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124,

NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, MltA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT y VapD.

5 31. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-30, en donde MltA se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB
10 (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, HisD, GNA1870, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB 1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT y VapD.

 32. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-31, en donde GNA1870 se selecciona junto con
15 por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, HisD, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964,
20 NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, NM-ADPRT y VapD.

 33. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-32, en donde NM-ADPRT se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
consiste de: PilC, MafA, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp,
25 NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA,

LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, HisD, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

34. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 5 reivindicaciones 1-33, en donde MafA se selecciona junto con por lo
 menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de:
 PilC, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB
 1162, NMB1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB
 (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, HisD,
 10 OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293,
 NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

35. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 reivindicaciones 1-34, en donde MafB se selecciona junto con por lo
 menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de:
 15 PilC, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB
 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB
 (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, HisD,
 OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293,
 NMB0315, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

20 36. La composición inmunogénica de acuerdo con las
 reivindicaciones 1-35, en donde NMB0315 se selecciona junto con
 por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
 consiste de: PilC, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB
 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA,
 25 LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA,

HimD, HisD, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

37. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-36, en donde NMB1119 se selecciona junto con
 5 por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, HisD, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964,
 10 NMB0293, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

38. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-37, en donde HisD se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB
 15 1162, NMB1220, NMB1313, NMB 1953, HtrA, PldA, LbpA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

39. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-38, en donde LbpA se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafB, Omp26, NMB0995, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB
 20 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB1119, TdfH,
 25

PorB, y VapD.

40. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-39, en donde NMB 0995 se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que
5 consiste de: PilC, MafB, Omp26, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, OstA, TspA, TspB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

10 41. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-40, en donde Lipo28 se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafB, Omp26, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, TbpB (bajo), TbpB
15 (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, HimD, OstA, TspA, TspB, P2086, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

42. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-41, en donde HimD se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de:
20 PilC, MafB, Omp26, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, PldA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, OstA, TspA, TspB, P2086, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

43. La composición inmunogénica de acuerdo con las
25 reivindicaciones 1-42, en donde NMB1313 se selecciona junto con

por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafB, Omp26, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1953, HtrA, PldA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, OstA, TspA, TspB, P2086, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

44. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-43, en donde NMB1953 se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilC, MafB, Omp26, FhaC, FbpA, Bcp, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, HtrA, PldA, TbpB (bajo), TbpB (alto), HpuA, HpuB, proteasa IgA, AspA, OstA, TspA, TspB, P2086, Sibp, NMB0964, NMB0293, NMB1119, TdfH, PorB, y VapD.

45. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 5-44, en donde la célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de lgtB o lgtE, preferiblemente el primero.

46. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 5-45, en donde la célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior es incapaz de sintetizar el polisacárido capsular y ha sido preferiblemente diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de siaD, crtA, ctrB, ctrC, ctrD, synA (equivalente a synX y siaA) o synB (equivalente de Sian) y synC (equivalente de siaC), preferiblemente siaD.

47. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 5-46, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión
5 de uno o más de OpC, OpA, o PorA, preferiblemente PorA.

48. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 5-47, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión
10 de FrpB.

49. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 5-48, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión
15 de msbB y/o hrtB, preferiblemente msbB.

50. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 5-49, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior que contiene LPS, el cual se conjuga con una proteína de membrana
20 exterior (OMP).

51. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el LPS se conjuga (preferiblemente Inter-ampolla) con OMP *in situ* en la preparación de la vesícula de membrana exterior.

25 52. La composición inmunogénica de acuerdo con las

reivindicaciones 1-51, que comprende un antígeno derivado de *Neisseria meningitidis*, preferiblemente el serogrupo B.

53. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-52, que comprende un antígeno derivado de *Neisseria gonorrhoeae*.

54. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-52, en donde todos los antígenos neisserial se derivan de *N. meningitidis*, preferiblemente del serogrupo B.

55. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-54, en donde todos los antígenos neisserial comprenden uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos.

56. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 55, en donde los polisacáridos u oligosacáridos capsulares se derivan de bacterias seleccionadas del grupo que consiste de: serogrupo A, C, Y y W-135 de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae b*, *Streptococcus pneumoniae*, Grupo A de *Streptococci*, Grupo B de *Streptococci*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

57. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 55-56, en donde el polisacárido u oligosacárido capsular está conjugado a una proteína.

58. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-57, que comprende un auxiliar.

59. La composición inmunogénica de acuerdo con la

reivindicación 58, que comprende sales de aluminio, preferiblemente fosfato de aluminio.

60. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 58 o 59, que comprende 3D-MPL.

5 61. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-60, y un portador farmacéuticamente aceptable.

62. Una vacuna que comprende uno o más polinucleótido(s) que codifican dos o más diferentes proteínas cuya expresión se conduce
10 a través de un promotor eucariótico, en donde las proteínas se seleccionan de por lo menos dos de las siguientes categorías:

a) por lo menos una adhesina *Neisserial* seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, PilC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119 y NadA;

15 b) por lo menos una autotransportadora *Neisserial* seleccionada del grupo que consiste de Hsf, Hap, proteasa IgA, AspA y NadA;

c) por lo menos una toxina *Neisserial* seleccionada del grupo que consiste de FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD y NM-ADPRT;

d) por lo menos una proteína de adquisición de Fe *Neisserial*
20 seleccionada del grupo que consiste de TbpA alto, TbpA bajo, TbpB alto, TbpB bajo, LbpA, LbpB, P2086, HpuA, HpuB, Lipo28, Sibp, FbpA, BfrA, BfrB, Bcp, NMB0964 y NMB0293; o

e) por lo menos una proteína asociada con membrana *Neisserial*, preferiblemente una proteína de membrana exterior
25 integral seleccionada del grupo que consiste de PilQ, OMP85, FhaC,

NspA, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpA, HpuB, TspA, TspB, TdfH, PorB, HimD, HlsD, GNA1870, OstA, HlpA, MltA, NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA y PldA.

63. Un método para el tratamiento o prevención de enfermedad
5 Neisserial que comprende la administración de una dosis protectora de la vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 61-62 a un huésped en la necesidad de la misma.

64. El método de acuerdo con la reivindicación 63, en el cual se previene o trata una infección por *Neisseria meningitidis*.

10 65. El método de acuerdo con la reivindicación 63, en el cual se previene o trata una infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

66. Un uso para la vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 61-62, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infección Neisserial.

15 67. El uso de acuerdo con la reivindicación 66, en el cual se previene o trata infección por *Neisseria meningitidis*.

68. El uso de acuerdo con la reivindicación 66, en el cual se previene o trata infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

20 69. Una cepa Neisserial genéticamente diseñada a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior de acuerdo con las reivindicaciones 5-60.

70. Un método para hacer la composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-60, que comprende un paso para mezclar junto con por lo menos dos antígenos de *Neisseria*.

25 71. Un método para hacer la composición inmunogénica de

acuerdo con las reivindicaciones 5-60, que comprende un paso para aislar las vesículas de membrana exterior de un cultivo Neisserial.

72. El método de acuerdo con la reivindicación 71, que comprende un paso adicional para combinar por lo menos dos
5 preparaciones de vesícula de membrana exterior.

73. El método de acuerdo con la reivindicación 72, en donde por lo menos una preparación de vesícula de membrana exterior contiene LPS del Inmunotipo L2 y por lo menos una preparación de vesícula de membrana exterior contiene LPS del inmunotipo L3.

10 74. El método de acuerdo con las reivindicaciones 71-73, en donde las vesículas de membrana exterior se aíslan a través de la extracción con una concentración de DOC de 0-0.5%.

75. El método de acuerdo con la reivindicación 74, en donde las vesículas de membrana exterior se aíslan a través de extracción
15 con una concentración de DOC de 0.02%-0.4%, 0.04%-0.3%, 0.06%-0.2%, 0.08%-0.15% o preferible o exactamente alrededor de 0.1%.

76. Un método para hacer la vacuna de acuerdo con la reivindicación 61, que comprende el paso de combinar la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-60 con un
20 portador farmacéuticamente aceptable.

77. Un método para preparar una globulina inmune para uso en la prevención o tratamiento de infección Neisserial que comprende los pasos de inmunizar un receptor con la vacuna de la reivindicación 60 y aislar globulina inmune del receptor.

25 78. Una globulina inmune preparada a través del método de la

reivindicación 77.

79. Una composición farmacéutica que comprende la globulina inmune de la reivindicación 78 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 80. Un método para el tratamiento de infección Neisserial que comprende un paso para administrar a un paciente una cantidad efectiva de la preparación farmacéutica de la reivindicación 79.

81. Un uso de una preparación farmacéutica de la reivindicación 79, en la fabricación de un medicamento para el
10 tratamiento o prevención de enfermedad Neisserial.

82. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 5-80, que comprende una ampolla meningocócica del inmunotipo L2 y una ampolla meningocócica del Inmunotipo L3.

83. La composición inmunogénica de acuerdo con la
15 reivindicación 82, en donde TbpA(alto) se regula de manera ascendente en una de las ampollas.

84. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 82 u 83, en donde la TbpA(baja) se regula de manera ascendente en una de las ampollas.

20 85. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 82-84, en donde Hsf se regula de manera ascendente en una de las ampollas.

86. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 82-85, en donde OMP85 se regula de manera
25 ascendente en una de las ampollas.

87. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 82-86, en donde las ampollas se aíslan de cepas meningocócicas incapaces de formar polisacáridos capsulares, preferiblemente siaD⁻.

5 88. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 82-87, en donde las estructuras de oligosacárido de LPS L2 y/o L3 son truncadas de acuerdo con las ampollas que han sido aisladas de cepas meningocócicas que son lgtB⁻.

10 89. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 82-87, en donde las ampollas se aíslan de cepas meningocócicas que tiene expresión de manera descendente de msbB.

15 90. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 82-89, en donde las porciones de oligonucleótidos de LPS L2 y/o L3 se conjugan de forma intra-ampolla a las proteínas de membrana exterior integrales a la ampolla.

20 91. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 82-90, en donde las ampollas se derivan de cepas meningocócicas que tienen expresión regulada de manera descendente de uno o más de: FrpB, PorA, Opa u Opc.

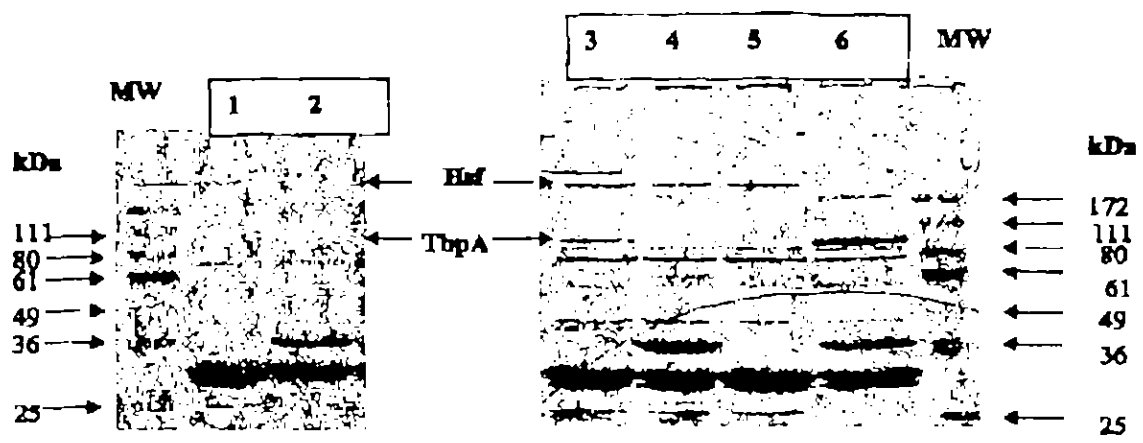


FIG. 1

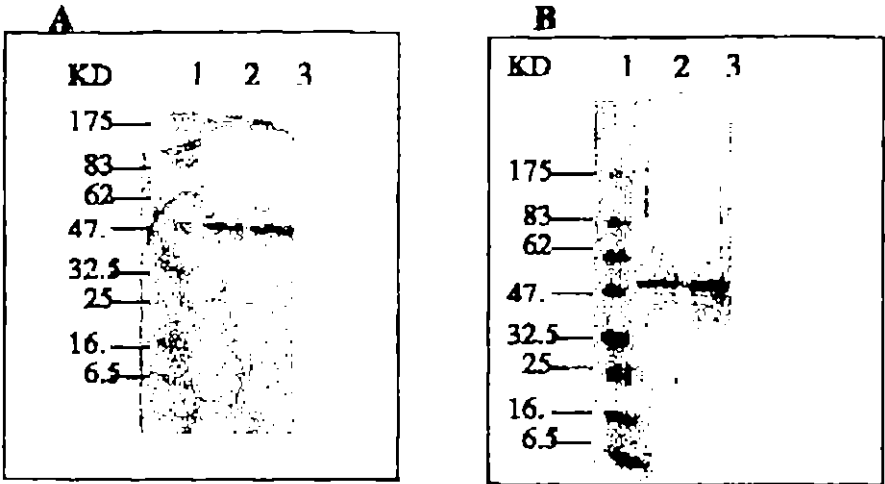


FIG. 2

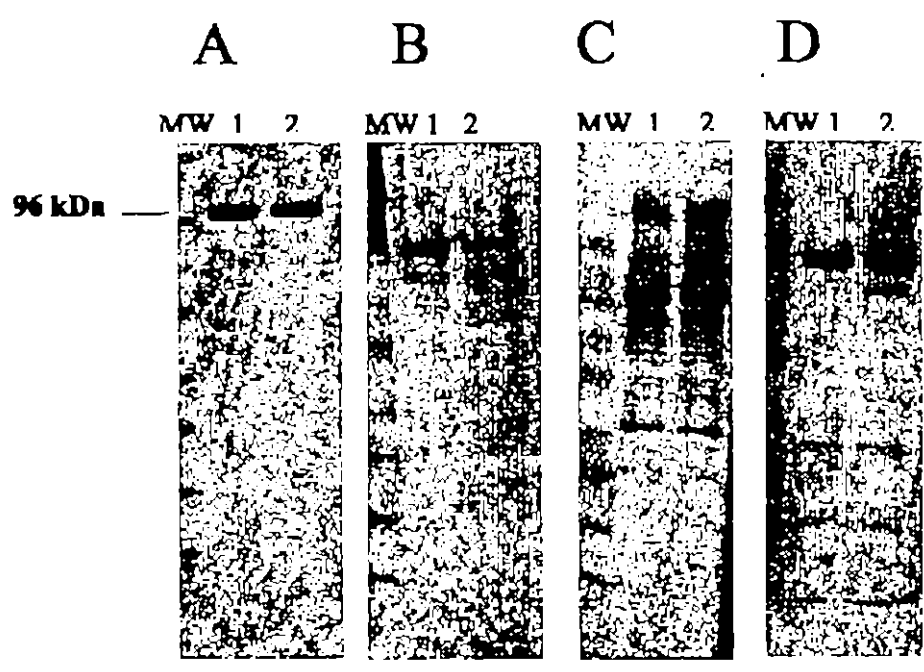


FIG. 3

4/11

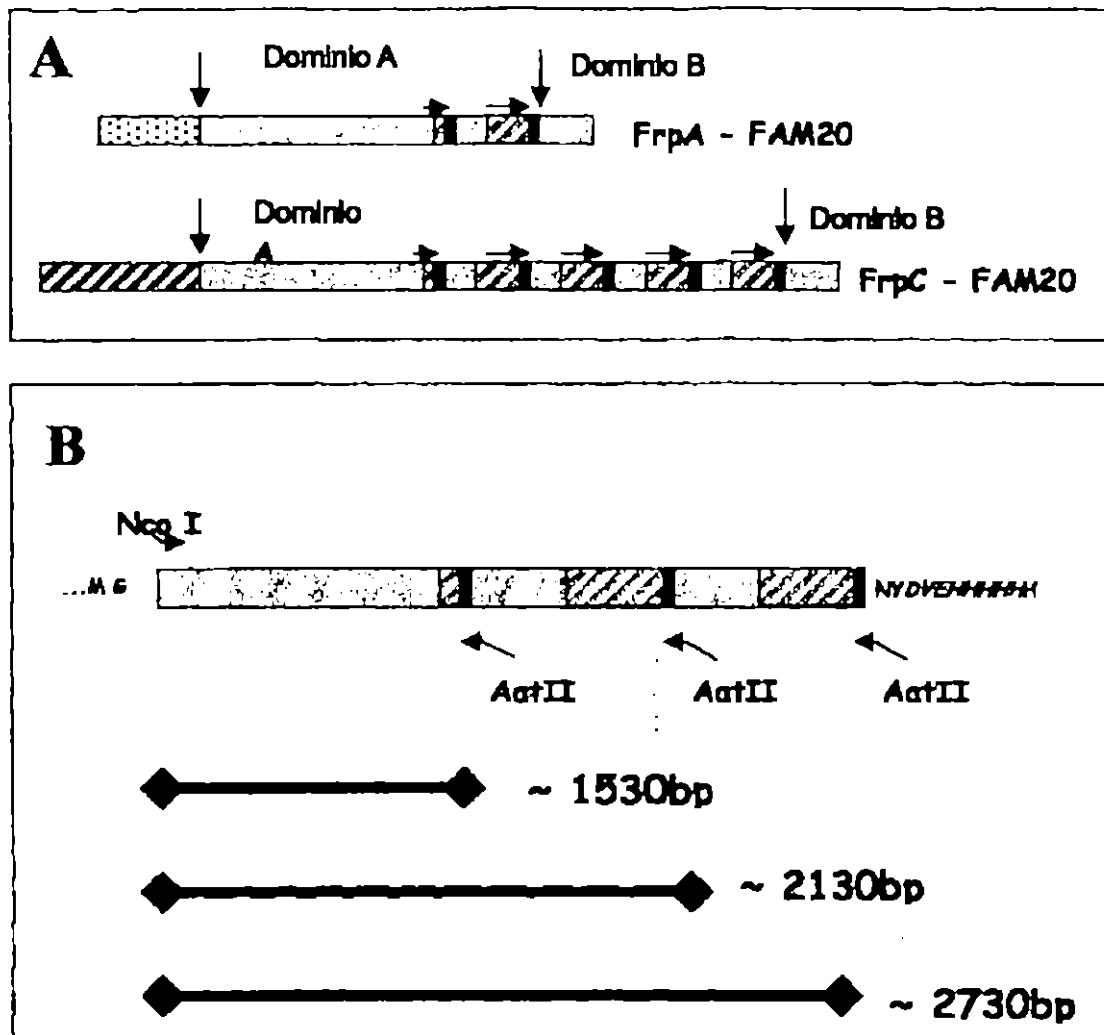


FIG. 4

5/11

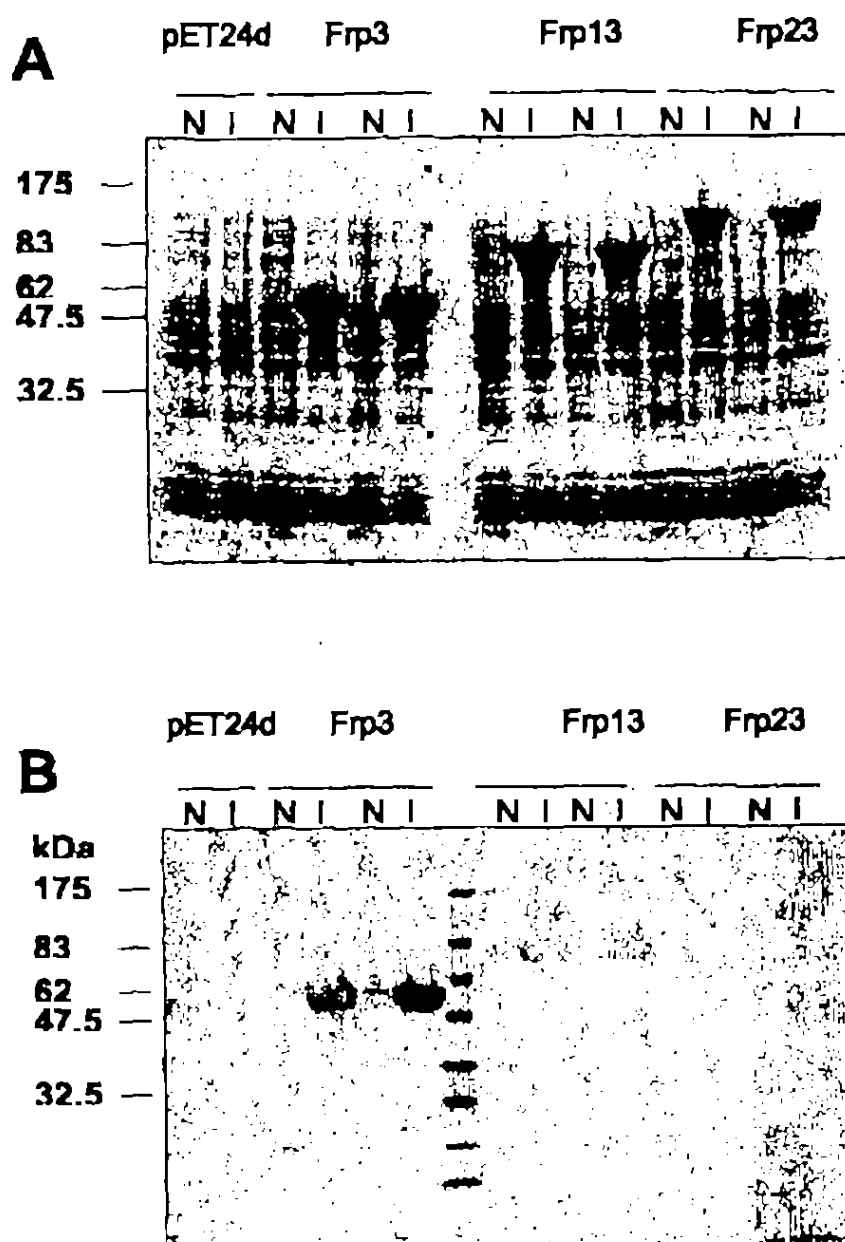


FIG. 5

8/11

5' -

ATGAATATAAGGTTTACATCGCATATCTTTASTAAAAAGCACAGCACCATGTTTGCCTAGCCGAAACT
 GCCAACAGCCGAGGGCAAAAGTTAAACAGGCGGCACTTCGGTTTCTGTTCACSTGAAAACTTCAGGCGAC
 CTTTGGCGCAAACTCAAAACCACTTTAAACTTTGGTCTGCTCTTTGGTTTCCCTGAGTATGGTATTG
 CCTGCCCATGCCCCAATTACCAACGACAAATCAGCACCTAAAAACAGCAGGTCGTTATCTTAAARCC
 AACACTGGTCCCCCTTGGTGAATATCCAACTCCGAATGGAGCGGATTTGAGCCACAAACGGCTATAAG
 CAGTTTGATGTTGACAAACAAAGGGCAGTTTAAACAAACGACCGTAACAAATATCCGTTTGTGGTCAAA
 GGCAGTGGCAATTTGATTTTGAACGAGGTACCGGTACCGCTAGCAAACTCAACGGCATCTTACCGTA
 GCGGTTCAAAAGGCCGACCTGATTATTGCCAACCCCAACGGCATTACCGTTAATGGCGGCGCTTTAAAR
 AATGTCGGTGGGGCATCTTAACTACCGTGGCGCCCAAAATCGGCAAGACGGTGCAGTACAGGATTT
 GATGTCCTTCAAGGCACATTGACCTTAGGAGCAGCAAGTTGGAAATGATAAAGCGGAGCGCACTACACCT
 GGGCTACTTGGCTCGTCAAGTTGCTTTGCAAGGGAAATTACAGGTAAARACCTGGCGGTTTCTACCGGT
 CCTCAGAAAGTAGATTACGCCAGCGGCGAAATCAGTGCAGGTACGCCAGCGGTAAGCAACCGACTATT
 CCGCTTGAATACTGCCCACTGGGCGTTATGTAACCCGACAGCATCACACTGATTGCCAATGAARAGGC
 GTAGCGGTCAAAATGCCGCGCACTCGAAGCGGCCAAGCAATGATTGTGACTTCGTACGGCGGCATT
 GAAACAGCGCGCGCTGCGCACCACTGCGAGCGGCACCGAAGCTTCAUCGACTTATCTCTCCATCGAR
 ACCACCGAARAAAGGAGCGGCGGCGCACTTTATCTTCAATGCTGCTCGATCGAAGCAAGCGCTTAATTG
 GTTATTGACACGGGAGAGGTATCAGCTTGCCTAAAGGAGCGGTGTCAGAAATAACCGCAGTCCGCCA
 GCTACCACCGTATTAAAGCTGCTCATATTTTGGTATTGAGAGCAAACTAATGTGAACATGCCAAA
 GCGCCGGCTACTCTGTGGCGGAGCGGCGGTACCGTCAATCAAGGAGCGCAATTTACGACTGGCACTACC
 GTATACAGTTCCAGCAAGGCAACCGCGAATTAGGCAATAACACAGCGCATTTACCGGGCAGATGTTACC
 GTATTATCCAAAGGCAACCTCAGCACTTCGCGCGTAAATAGATGCGAAGACACCGCACACATCGAAGCA
 GGCAAACCGCTTTCTTGGAGGCTTCAACAGTTTACCTCGAATATCGGCTTAAACGGAGGCAATGTCAG
 GCGCGCAAGCAAGCTTCTTACTGGCAGACGATAACATTACTGCGCAAACTACCAATCTGATTACTCCC
 GCGAATCTGTATGTTTCATACAGGTAAAGATCTGAATTTGAATGTTGATTAAGATTTGCTTGGCCCGAGC
 ATCCATTGGAATCGGATAAGCTGCGCAATTTACCGGCACCGGTAAACCGCTCACTGCCCTCAAAAGAC
 ATGGGTGTGGAGGCGCGCTCGCTGAATGTTACCAATACCAATCTGCGTACCACTCGGGTAATCTGCGAC
 ATTCAAGGCAAGCAAGGCAATATTGCGTTGCAATACCAAGCTGAACGCAAGCGCTCTCGAAGCC
 ACCGCATTGCGAGGCAATATCGTTTCAAGCGCGCTTCAATGCTGTTCTGCGAGCGGTCAATGATCTTA
 TTGGCCAAAGGTAATGCGCACTTTACCGGTCAATATCCCTGAGCGCAAGCGCGATGTAATGAGGA
 TCGGTTGGTAAAGGCGCTGTAAGGCAAGCAATACCAATATCACTTCACTTTAGGAGATATTACGTTG
 GTTCCCGCAAGCGTATTGAGCTTGTGACGGAAGCAAGCGCAATTCATCAACGGAAGCAACATCAGC
 ATCAAAACAAAGCGTGTGATGCGCACTTAAAAACCTTAACGTCCATGCCAAAAGCGGGCATTTAAG
 ATTCAATTCAGCGCGCATTTGAGCATAGAAATACCAAGCTGGAATCTACCCATAATACGCACTTAAAT
 GCACACACGAGCGGTAAAGCTCAACCAAGTAGATGCTTACGACACAGCTCATCTAAGCATTTACCGGC
 AGCCAGATTTGGCAAAAGCAAACTGCGCTTCGCGAAGCAAGCTGTTGGCTAAGCGGTGATTGCGCACTC
 AATGGCGCTATTCCCAAAATTCGCGACAAACCCAGCTGAGAGTGGGTGCAATCAACCTTACTGCGCGT
 ACCGCGCTAGTCAAGCGCGCAACATCAATGGAATACCGTTTGGACCAAACTTTGGAGATTAATGCC
 GAATCAAAACCATTTGCCCGACCGCTGAATTTGAAGCAGGTAGCGGCACATTAAACCATTAACCTGCC

FIG. 6

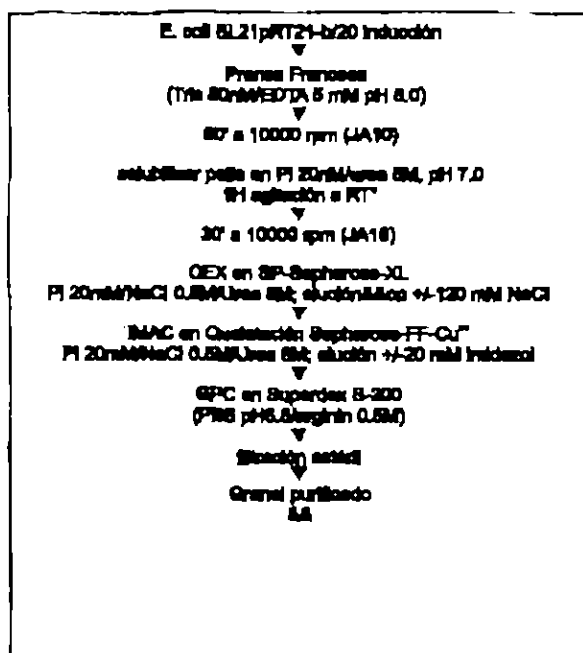
7/11

AACCGGATCAGTTGCGATACCGACCTGAGCA TCAAAACAGGCGGAAATTCCTGTCTCTGCAAAAGGA
 GTAAATCCAGGTTTCGCCAGTCTCAAGTTTCTTCATTGGAGGCAAAAGTCAATATCCGTCTGCTTACA
 GGAGAAACAGATTTAAGAGGTTCTMAAATTACAGCCGCTAATAACTTGGTTCTGCGCACCAACCAAGGC
 AATTGAAATATGAAAGGCGTAAAGAACTCAATTCAGCAATTAATTCTCTACACAAAAGGCGCTGAACCT
 AACCAAAATCCAAAGGATTGGAAACAGCAGATTCGACAGTTGAAAGAAAGCTCGCTTAAGCAAGCTG
 ATTCGAACCTGCAAGAAAGAACCGGACGCTCTGCTTTCTAATTCAGCCATCAACAAAGGAGTAA
 GGTAAAAACCCAAAGGCAAGAAATACCTGCAAGCCAAAGCTTCTGCACAAAACATTAAGTTGATTTCC
 GCAAAAGGCAATCGAAATCGGCGTTCTGATATACCGCTTCAAAAGAACTGAACCTTCAGCGCGCAGGC
 GTATTCCAAAGGCAAGCAGATTCGAAAGGCGGCTGCTATTCTGATTAAGCGCAATACGCAAGCAATAGAA
 ATTCGCAAGGCGCAGCTACAGAGTCACTACGACAAAGCTGCTCTGAACAGGCTTCAGCTTTGAAGCGAA
 CTTACAGGCGTAAGTATCTAGGCAAGCTGCGGACCTGATGATGACGTAATTATTAAGGTCATCGGA
 ATCAAGGCTCCCTCAGGCGCATAGACATCAAGGCGCAAGTATATTTGATCTGCAAGCTTGACAAAG
 GATTCCTATACCTTCTTAAAGGCAAGGTAAGAGGCGCAAAATCATCAAGAAAGCAAGTTTACAGG
 ACCCGCAACAGCTGATTAATGCGAGCGCGCTGAGCTGACCGCGAACGCAATAGGCTTCAGGCGAGG
 GCGAAGATCGAAGGCAATACCACTGCTTCAATGCTGCGCAAGTAAAGTTAGCCTGCTTGGGCGTGA
 GAGCTGCAACTGCTGCGAGAGGAAAGCAATCAAGAGCAAGGCTTGGATTTGCAAAAGGCGCGGCTTT
 ATGCGCATCAAGGTAAGGCAAGGCAATACAGTAAAGAGAGCTGAGAGGCAAGCTTAAGCTTCTGCGC
 CTGCTGCGCGCAAGTCAAGCGCGGCTTCAAGCTGAGATTAAGCTTCTGAGAGGTAAGCAATCAAGAGC
 AAGCTTGGCGGTCAGCAAGTCAAGGCTGAGAGGCAAGGCTTCAAGCTGAGAGGTAAGCAATCAAGAGC
 AAGGCAATTTGAGAGCTTATCGGCTGAGAGGCAAGTAAAGTAAAGCAAGTCAAGCTTATGAGAGGCAAG
 GCGAGAGGCGGCAAGCACTATCAAGAGCTTAAAGCTGAGAGGCTTCAAGAGGCTTATGAGAGGCAAG
 AGTGGCGCGGCTGAGAGTATGCTTCAAGATTCAGAGGCAAGTAAAGTAAAGCAAGTCAAGAGGCTGCGC
 AAACAGAGGAGTATGCTTATCTGAAGAGGCTTCAAGTAAAGCAAGTAAAGTAAAGCAAGTCAAGAGGCTTATGAGAGT
 AAGCAATA STOP -3'

FIG. 6 (continuación)

8/11

A



B

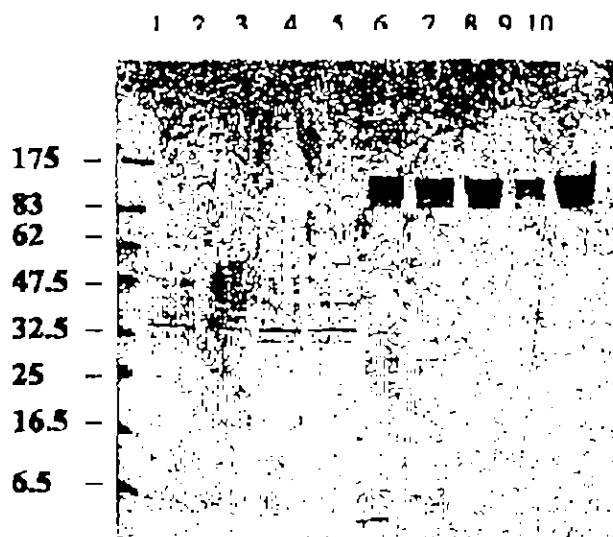


FIG. 7

8/11

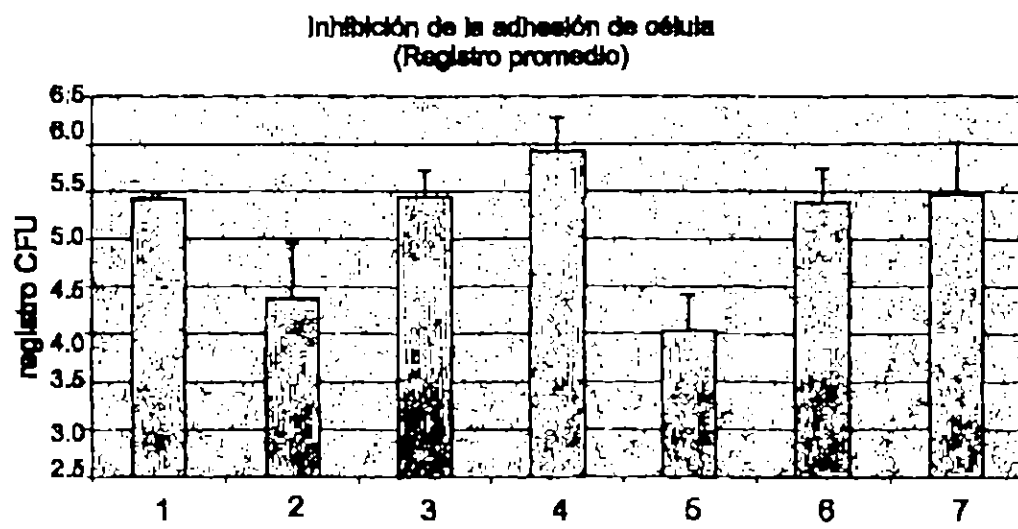


FIG. 8A

10/11

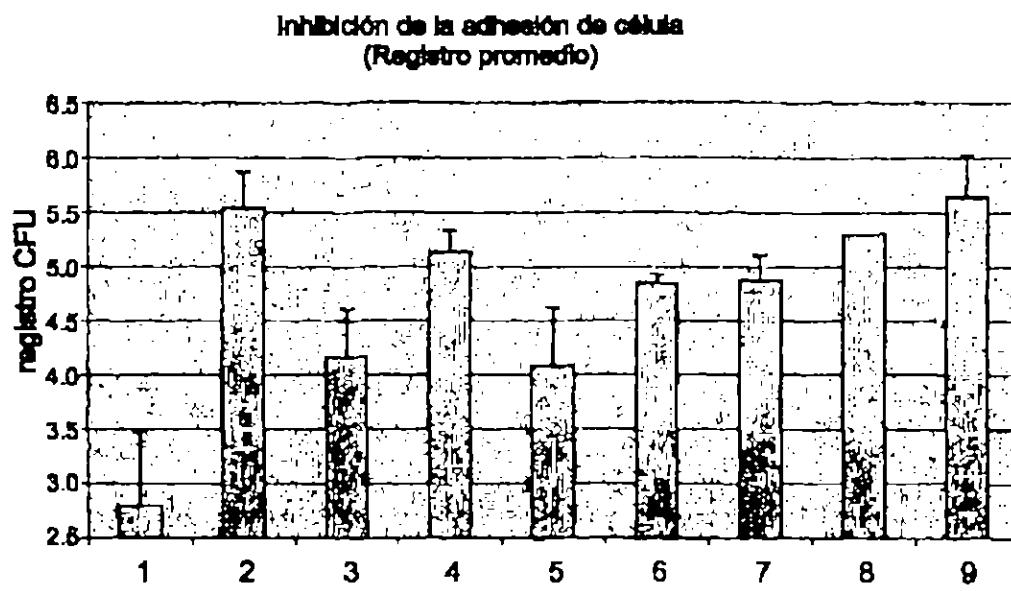


FIG. 8B

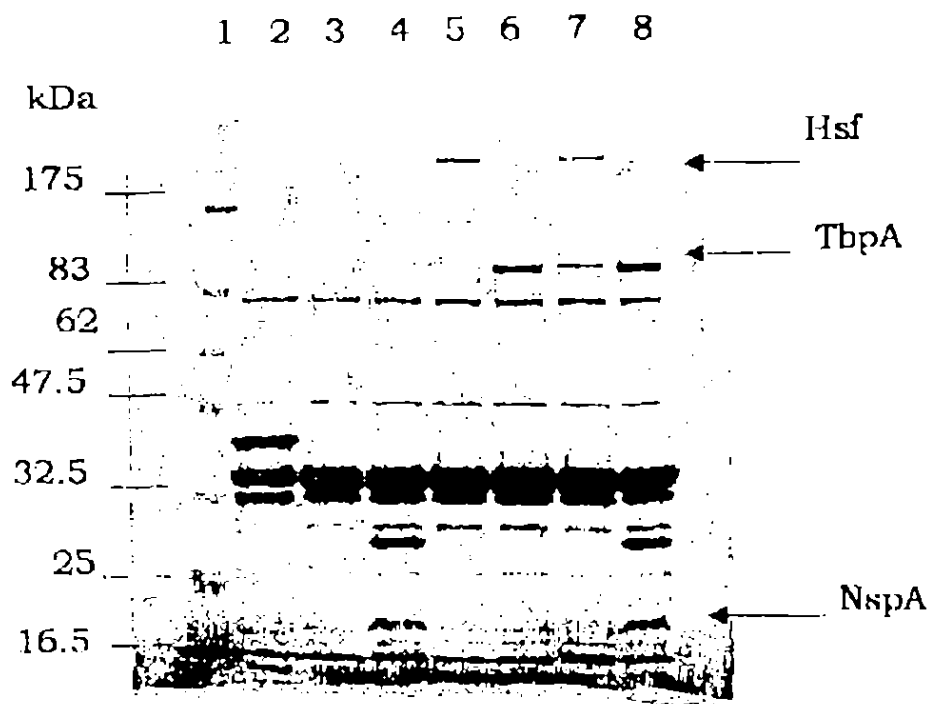


FIG. 9

Cs
Anexo 5 Exam. Prel

240
238

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 05807266 00000000

Folios: 239

Fecha (AMP): 2005-01-20 15:39:37

Trámite: 1 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Remedios: 0000 DISTRIBUION DE MUESTRAS INFORMES



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒ [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- ♦ Descripción de la invención [X] 61
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes [X] 229
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA ☒ [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ♦ Indicación de que se 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 trazado []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia M Neva
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Folio 241

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor(a)
ALICIA LLOREDA RICAURTE
Representante y/o Apoderado(a)

Oficio N° **12461**

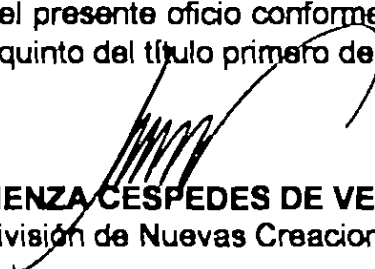
ASUNTO:	Radicación N°	05-7266
	Solicitud internacional	PCT/EP2003/008571
	Fecha inicio fase nacional	02/03/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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:

- Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT).
- La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486/00.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 01 ABR 2005

202027

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 Conmutador: 3820840
Fax: 382 26 95. Línea 9800-910 185
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia