

LLOREDA & CIA. S. A.

ABOGADOS

BOGOTA - COLOMBIA
OFICINA FUNDADA EN 1941

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COM
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-007268- -00007-0000

Fecha: 2008-07-30 18:10:37 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 442304
9700
9701
DA
PISO
com
www.superintendencia.com

Re: **P1.-GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.-Solicitud de Patente de**
Invención en Fase Nacional PCT para "COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE
COMPREDEN LIPOOLIGOSACÁRIDOS DEL INMUNOTIPO L2 Y/O L3 A
PARTIR DE lgtB(-) NEISSERIA MENINGITIDIS".-Clase A61K 39/095.-
Expediente número 05-007.268.-

1. Me refiero a mi memorial de 29 de Julio de 2008.
2. Dando alcance a dicha comunicación, me permito adjuntar copia del nuevo texto de la descripción, anunciado como anexo en el numeral 6.1 1) párrafo tercero, página 5 y que por equivocación no se acompañó al momento de la radicación. ???
3. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,


 ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

**COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN LIPOOLIGOSACÁRIDOS DEL
INMUNOTIPO L2 Y/O L3 A PARTIR DE lgtB(-) Neisseria Meningitidis**

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de composiciones de vacunas de Neisseria, su fabricación, y el uso de dichas composiciones en medicina. Más particularmente se refiere a procedimientos de fabricación de nuevas cepas meningocócicas modificadas genéticamente que son más adecuadas para la producción de vacunas de vesículas (o blebs) de membrana externa, de Neisseria, en particular meningocócica. Los procedimientos ventajosos y productos de vacunas también se describen a base del uso de vacunas nuevas de subunidades de LOS o de vesículas (o blebs) de membrana externa meningocócicas que se han obtenido más seguras y/o más eficaces para uso en sujetos humanos. En particular se describen las combinaciones de regulaciones hacia niveles menores de genes tales como PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, y Por A y OpA y OpC. Alternativamente o además, se muestra que lgtB⁻ es una mutación óptima para usar eficazmente y con seguridad LOS L3 y/o L2 en composiciones de vacunas de Neisseria. También se describen adicionalmente las vacunas de vesículas derivadas de lgtB⁻ y mutantes meningocócicos deficientes en polisacáridos capsulares; ya que son procedimientos ventajosos para fabricar preparaciones de vesículas donde LOS se va a conservar como un antígeno importante.

COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN LIPOOLIGOSACÁRIDOS DEL INMUNOTIPO L2 Y/O L3 A PARTIR DE IgtB(-) *Neisseria Meningitidis*

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las composiciones de vacunas de *Neisseria*, su fabricación y la utilización de dichas composiciones en medicina. Más particularmente se refiere a procedimientos para fabricar cepas meningocócicas nuevas modificadas genéticamente que son más adecuadas para la producción de vacunas de *Neisseria*, en particular meningocócicas, de vesículas de la membrana externa (o blebs). También se describen los procedimientos ventajosos y productos de vacunas a base del uso de nuevas vacunas de subunidades de LOS o de vesículas de la membrana externa (o blebs) que se han mostrado más seguras y más eficaces para uso en sujetos humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Neisseria meningitidis (meningococo) es una bacteria Gram negativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. Es una causa de enfermedades bacterianas invasivas graves tales como bacteremia y meningitis. La incidencia de enfermedad meningocócica muestra diferencias geográficas, estacionales y anuales (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (suplemento), S18 - S24, 1989). La bacteria se clasifica comúnmente según el serogrupo de su polisacárido capsular.

La mayoría de enfermedades en los países templados se debe a cepas de serogrupo B y varía en incidencia entre 1 - 107100.000/año de total de población alcanzando algunas veces valores más altos (Kaczmarek, E. B. (1977), Común. Dis. Rep. Rev. 7: R55 - 9, 1995; Scholten, R. J. P. M., Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. y col. Clin. Infect. Dis. 16: 237 - 246, 1993; Cruz, C, Pavez, G., Aguilar, E., y col. Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990).

Las enfermedades epidémicas dominadas por meningococos del serogrupo A, la mayoría en África central, algunas veces alcanzan niveles de incidencia hasta de 1000/100.000/año (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (suplemento) S18 - S24 1989). Casi todos los casos como un conjunto de enfermedad

Arminjon, F., Mynard, M. C, Lafaix, C, J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982).

La frecuencia de infecciones de *Neisseria meningitidis* han crecido en las pasadas pocas décadas en muchos países de Europa. Esto se ha atribuido a un incremento de transmisión debido a un incremento de actividades sociales (por ejemplo, piscinas, teatros, etc.). Ya no es infrecuente aislar cepas de *Neisseria meningitidis* que son menos sensibles o resistentes a alguno de los antibióticos convencionales. Este fenómeno ha creado una necesidad médica no cubierta y demanda nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de fármacos y ensayos de diagnósticos para este organismo.

Las vacunas disponibles de polisacáridos se están actualmente mejorando por medio de su conjugación químicamente a proteínas portadoras (Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K., y col. JAMA 275: 1499 - 1503, 1996).

Sin embargo, no se dispone de una vacuna de serogrupo B. El polisacárido capsular de serogrupo B se ha encontrado que es no inmunogénico muy probablemente porque comparte estructuras similares con componentes del hospedador (Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L. y col. J. Infect. Dis. 126: 514 - 522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Mäkelä, P. M. Lancet ii.: 355 - 357. 1983). Por lo tanto se ha fijado el esfuerzo para tratar de desarrollar vacunas de serogrupo B de vesículas de la membrana externa (o blebs) o componentes proteicos purificados de los mismos.

Los antígenos meningocócicos alternativos para el desarrollo de vacunas son lipooligosacáridos meningocócicos (abreviadamente LOS). Éstos son glicolípidos unidos a la membrana externa que se diferencian de los lipopolisacáridos (abreviadamente LPS) de las Enterobacteriáceas por la carencia de las cadenas secundarias O y de este modo se parecen a la forma rugosa de LPS (Griffis y col., Rev Infect Dis 1988; 10: S287 -295). La heterogeneidad en el resto de oligosacáridos de los LOS genera diversidad estructural y antigénica entre diferentes cepas meningocócicas (Griffiss y col. Inf. Immun. 1987; 55: 1792 - 1800). Esto se ha utilizado para subdividir las cepas en 12 inmunotipos. Los inmunotipos L3, L7,

genéricamente como "L3"). Los LOS meningocócicos L3, 7, 9 (L3), L2 y L5 se pueden modificar mediante sialización o mediante la adición de ácido citidina 5'-monofosfato-N-acetilneuramínico. Aunque LOS L2, L4, y L6 son inmunológicamente distinguibles son estructuralmente similares y donde L2 es mencionado aquí, puede ser sustituido por L4 ó L6 dentro del alcance la invención. Los anticuerpos de LOS se ha mostrado que protegen en ratas experimentales contra la infección y contribuyen a la actividad bactericida en niños infectados con *N. meningitidis* (Griffiss y col. J. Infect Dis 1984; 150: 71 -79).

Sin embargo, un problema asociado con el uso de LOS en una vacuna meningocócica, es su toxicidad (debida a su resto de lípido A). } problema resolver.

Los LOS están también presentes en la superficie de vesículas meningocócicas. Durante muchos años los esfuerzos se han fijado en desarrollar vacunas a base de vesículas de la membrana externa meningocócica (o blebs) (de Moraes, J. C, Perkins, B., Camargo, M. C. y col Lancet 340: 1074 - 1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E. A. Gronnesby, J. K. y col 338: 1093 - 1096, 1991). Dichas vacunas tienen la ventaja de incluir diversas proteínas de la membrana externa en una conformación plegada adecuadamente que puede provocar una respuesta inmunológica protectora cuando se administra a un hospedador. Además, las cepas de *Neisseria* (incluyendo *N. meningitidis* serogrupo B - menB) excretan vesículas de membranas externa en cantidades suficientes para permitir su producción a escala industrial. Sin embargo, más a menudo las vesículas se preparan mediante procedimientos que comprenden una extracción con 0,5% de un detergente (por ejemplo, desoxicolato) de las células bacterianas (por ejemplo, EP 11243) que tiene el efecto de extraer un lote de los LOS a partir de la vacuna. Aunque esto es deseado debido a la toxicidad de LOS (también llamada endotoxina) como se ha descrito anteriormente, también tiene un efecto de remoción de la mayoría de los antígenos de LOS de la vacuna.

Un problema adicional con el uso de LOS como antígeno de vacuna es que los 12 inmunotipos de LPS existen con un intervalo diverso de estructuras de carbohidratos (M. P. Jennings y col. Microbiology 1999, 145, 3013 - 3021). Los anticuerpos que surgen contra un

inmunotipos de LOS (por ejemplo el documento WO 94/08021), la actividad bactericida de los anticuerpos generados contra los LOS modificados se pierde. De este modo una vacuna puede necesitar tener muchos componentes de LOS de inmunotipos diferentes para ser eficaz.

Existe un problema adicional con el uso de LOS (también conocidos como LPS o lipopolisacárido) como antígenos en vacunas humanas, particularmente que estos llevan estructuras de sacáridos que son similares a las estructuras de sacáridos de tipo humano (por ejemplo, en glóbulos rojos humanos), de este modo planteando una cuestión de seguridad con su uso. Cambiar la estructura de LOS es aún problemático debido a la sensibilidad estructural de la eficacia bactericida del antígeno de LOS.

La presente invención presenta procedimientos para la mejora de uno o más de los problemas anteriores y presenta procedimientos para fabricar nuevas vacunas a base de LOS meningocócicos como un antígeno protector, en particular cuando está presente en una vesícula de membrana externa.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La materia sujeta e información descrita en las publicaciones y patentes o solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan como referencia en esta memoria descriptiva,

La referencia a "lipooligosacárido" (o "LOS") también puede denominarse "lipopolisacárido" o "LPS".

Los términos "comprendiendo", "comprenden" y "comprende" en esta memoria descriptiva tiene la intención de los inventores de ser opcionalmente sustituibles con los términos "consistiendo en" "consisten en" y "consiste en" respectivamente en cada caso.

Los presentes inventores han encontrado que el acortamiento de las estructuras de oligosacáridos LOS conduce a la pérdida de epítomos que pueden provocar una respuesta inmune bactericida. En cambio, los inventores han encontrado que con el fin de utilizar LOS

producir una vacuna (preferiblemente meningocócica) de *Neisseria* universalmente eficaz. Un primer aspecto de la invención es una composición inmunogénica para la prevención o tratamiento de enfermedad de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica o meningocócica B) que comprende LOS (preferiblemente meningocócicos) de *Neisseria* de inmunotipo L2 y LOS de inmunotipo L3. Los LOS se puede aislar bien mediante procedimientos de purificación o pueden estar presentes en al menos 2 preparaciones de vesícula de membrana externa (o bleb) derivadas de cepas de *Neisseria* L2 y L3. Con el fin de eliminar la ligera toxicidad retenida en LOS de la preparación de vesículas, pero conservar altos niveles de antígeno de LOS integrado en la vesícula, se prefiere que se extraigan las vesículas usando una baja concentración de detergente 0 - 0,3%, preferiblemente 0,05 - 0,2%, más preferiblemente alrededor de 0,1%, preferiblemente desoxicolato (o abreviadamente DOC). Dicha combinación de antígenos de LOS particularmente en una vacuna de vesícula es sorprendentemente ventajosa siendo eficaz contra más del 90% de cepas de *N. meningitidis*.

Los autores de la invención también han encontrado que las composiciones inmunogénicas de dichas vesículas de la invención, y sin duda cualquier composición inmunogénica de vesículas derivada de *Neisseria* (preferentemente gonocócica o meningocócica) puede tener un efecto potenciado de antígenos protectores (incluyendo LOS) en su superficie si ciertas combinaciones de proteínas de membrana externa inmunodominantes se regulan hacia menores niveles de expresión (y preferiblemente suprimidas). Por consiguiente un segundo aspecto de la invención es una preparación de vesículas de *Neisseria* derivada de una cepa de *Neisseria* que ha tenido 2 o más de las siguientes proteínas de membrana externa reguladas hacia menores niveles de expresión y preferiblemente suprimidas, comparada con la cepa nativa no modificada: PorA, PorB, OpA, OpC o PilC. Preferiblemente PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, o PorA y OpA y OpC se regulan hacia menores niveles o se suprimen. La regulación hacia menores niveles (preferiblemente supresión) de expresión de FrpB se ha mostrado también que es beneficiosa potenciando el efecto de antígenos de protección cruzada particularmente en preparaciones de vesículas preparadas a partir de cepas de *Neisseria* desarrolladas en condiciones limitantes de hierro. Una vesícula de *Neisseria* derivada de una cepa con esta

más de las regulaciones hacia niveles menores mencionadas anteriormente. Se prefiere que si PorA es regulado a bajos niveles de expresión PorB no sea regulado a bajos niveles y viceversa. Dichas mutaciones son beneficiosas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) de la que las composiciones inmunogénicas de vesículas van a derivar, sin embargo se prefiere que se usen las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) de inmunotipo L2 o L3. Preferiblemente las composiciones inmunogénicas de vesículas de la invención contienen tanto vesículas L2 como L3 donde al menos una (y preferiblemente ambas) son deficientes en las combinaciones anteriores de las proteínas de membrana externa inmunodominante (u OMP). Las técnicas para la regulación hacia niveles menores de estos genes se describen en el documento WO 01/09350 (incorporado en esta memoria descriptiva como referencia). Se conocen cuatro diferentes genes Opa que existen en el genoma meningocócico (Aho y col., 1991 Mol. Microbiol. 5: 1429 - 37), por lo tanto cuando se dice que Opa se regula hacia niveles menores de expresión quiere decir que preferiblemente 1, 2, 3 o (preferiblemente) los 4 genes presentes en meningococos se regulan también hacia niveles menores. Dicha regulación hacia niveles menores se puede realizar genéticamente como se describe en el documento WO 01/09350 o por la búsqueda de cepas naturales meningocócicas, fáciles de encontrar, estables, que tienen nula o baja expresión de los loci Opa. Dichas cepas se pueden encontrar utilizando la técnica descrita en Poolman y col., (1985 J. Med. Micro. 19: 203 - 209) donde las células que son Opa tienen un fenotipo diferente a la células que expresan Opa que se pueden ver mirando la aparición de las células en placas o en un microscopio. Una vez encontrada, la cepa se puede mostrar que es establemente Opa mediante la realización de una transferencia Western en contenidos celulares después de que se realiza una fermentación para establecer la carencia de Opa.

Seguridad de las composiciones inmunogénicas de LOS anteriores

Se ha cuestionado la seguridad de los anticuerpos surgidos de LOS L3 o L2 debido a la presencia de una estructura similar al grupo de oligosacáridos de lacto-N-neotetraosa (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-; figura 1) presentes en glicofingolípidos humanos. Aunque un

Lancet (1991), 338, 1093 - 1096; GVG. Sierra y col., NIPH ann (1991), 14, 195 - 210), si LOS debe ser retenido como antígeno como se discute aquí, la supresión de una parte terminal de la estructura sacárida de LOS ha sido encontrada por los presentes inventores como ventajosa para prevenir la reacción cruzada de la respuesta inmune de los anti-LOS con las estructuras presentes en la superficie de tejidos humanos. En una realización preferida, la inactivación del gen *lgtB* da como resultado una estructura intermedia de LOS en la que el residuo de galactosa terminal y el ácido siálico están ausentes (véase la figura 1 y 2, la mutación deja una estructura 4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1- en LOS L2 y L3). Dichos intermedios se podrían obtener en una cepa de LOS L3 y L2. Una versión alternativa y menos preferida (corta) del LOS se puede obtener desactivando el gen *lgtE*. Una versión alternativa adicional y menos preferida de los LOS se puede obtener desactivando el gen *lgtA*. Si se selecciona dicha mutación de *lgtA* se prefiere también desactivar la expresión de *lgtC* para evitar el inmunotipo L1 no inmunogénico que se forma.

Los mutantes *lgtB*⁻ se prefieren más ya que los inventores han encontrado que es el truncamiento óptimo para resolver la cuestión de seguridad mientras todavía mantienen un epítipo de oligosacárido protector de LOS que todavía puede inducir una respuesta de anticuerpo bactericida (o incluso bactericida cruzada).

Por lo tanto, las preparaciones anteriores L2 o L3 (si están purificadas o en una vesícula aislada) de las preparaciones de la invención o de vesículas meningocócicas (particularmente L2 y L3) se derivan en general ventajosamente de una cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica) que se ha modificado genéticamente para regular hacia niveles menores permanentemente la expresión del producto génico funcional de *lgtB*, *lgtA* o el gen *lgtE*, preferiblemente inactivando el gen , más preferiblemente suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen.

Preferiblemente las cepas de *Neisseria* de la invención son deficientes en la síntesis del polisacárido capsular.

Cuando las preparaciones de vesículas de la invención se derivan de una cepa de meningococo B, se prefiere adicionalmente que también se elimine el polisacárido capsular (que

ventajosamente que se prefiere que la cepa de producción de vesículas se modifique genéticamente para regular hacia niveles menores permanentemente la expresión del producto génico funcional del gen *siaD* (es decir, regulando hacia niveles menores la actividad de α -2-8 polisialiltransferasa), preferiblemente inactivando el gen, más preferiblemente, suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. Dicha inactivación se describe en el documento WO 01/09350. La mutación *siaD* (también conocida como *synD*) es la más ventajosa de muchas mutaciones que pueden dar como resultado la eliminación del epítipo similar al humano del polisacárido capsular, porque es una de las únicas mutaciones que no tienen efecto en la biosíntesis de los epítipos protectores de LOS, de esta manera siendo ventajosa en un procedimiento que pretende usar finalmente LOS como antígeno protector y tiene un efecto mínimo en el desarrollo de la bacteria. Un aspecto preferido de la invención es por lo tanto una preparación inmunogénica de vesículas como se ha descrito anteriormente que se deriva de una cepa mutante de meningococo B una *IgtE⁻ siaD⁻*, una *IgtA⁻ siaD⁻* o preferiblemente una *IgtB⁻ siaD⁻*. La cepa en sí misma es un aspecto adicional de la invención.

Aunque la mutación *siaD⁻* es preferible por las razones anteriores, se pueden utilizar otras mutaciones que inactivan la síntesis de polisacárido capsular de meningococo B (o meningococos en general). De este modo la cepa de producción de vesículas se puede modificar genéticamente para regular permanentemente hacia niveles menores la expresión del producto génico funcional de uno o más de los genes siguientes: genes *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *SiaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*), preferiblemente inactivando el gen, más preferiblemente suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. La mutación *lrte⁻* se puede combinar con una o más de estas mutaciones. Preferiblemente la mutación *IgtB⁻* se combina con una o más de estas mutaciones. Un aspecto adicional de la invención es por lo tanto una preparación inmunogénica de vesículas como se ha descrito anteriormente que se deriva de dicha cepa mutante combinada de meningococo B (o meningococos en general). La cepa en sí misma es un aspecto adicional de la invención.

145, 3013 - 3021 y las referencias citadas en esta memoria descriptiva y J. Exp. Med. 180: 2181 - 2190 [1994]).

Cuando LOS de longitud completa (no truncada) se va a utilizar en el producto final, es deseable para LOS que no sea sializado (de este modo LOS genera una respuesta inmune contra las cepas de meningococo B invasivas, más peligrosas que también están sin sializar). En dicho caso es ventajoso el uso de una cepa negativa de cápsula que ha suprimido el gen synA (equivalente a synX y siaA), synB (equivalente a siaB) o synC (equivalente a siaC), de tal manera que esta mutación también produce LOS menB incapaz de ser sializados.

Las mutaciones anteriores son benéficas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) de la cual las composiciones inmunogénicas de vesículas se derivan, particularmente aquellas descritas aquí. Sin embargo, se prefiere el uso de las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) del inmunotipo L2 ó L3, típicamente extraídas con un proceso de extracción con bajo % DOC como se describe aquí. Preferiblemente las composiciones inmunogénicas de vesículas de la invención contienen vesículas de ambos L2 y L3, donde al menos una (preferiblemente ambas) se derivan de cepas deficientes en la expresión de los genes anteriores.

La toxicidad de LOS

Los LOS anteriormente purificados o composiciones inmunogénicas de vesículas de la invención también se pueden hacer menos tóxicas mediante la regulación hacia niveles menores de expresión de ciertos genes en la cepa de producción bacteriana de la que se derivan. Aunque dicha detoxificación puede ser no necesaria para inmunización intranasal con OMV de tipo nativo (J. J. Dabrick y col., Vaccine (2000), 18, 160 - 172), presentaría una ventaja para la detoxificación de la vacunación parenteral. Preferiblemente los LOS, LOS purificados o composiciones inmunogénicas de vesículas de la invención se detoxifican genéticamente mediante ingeniería genética de la cepa de producción de *Neisseria* mediante

la modificación/inactivación de los genes implicados en la biosíntesis de Lipido A

génico funcional de los genes *msbB* y/o *htrB* y preferiblemente mediante la inactivación del gen, más preferiblemente mediante la supresión de todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. Alternativamente (o además) los LOS purificado o las composiciones inmunogénicas de vesículas se pueden derivar de una cepa de *Neisseria* que se ha modificado genéticamente de manera que uno o más de los siguientes genes se regulan hacia niveles mayores (mediante la introducción de un promotor más fuerte o integrando una copia extra del gen): *pmrA*, *pmrB*, *pmrE* y *pmrF*. Alternativamente (o además) los LOS purificados o las composiciones inmunogénicas de vesículas se pueden detoxificar mediante la adición de equivalentes funcionales peptídicos no tóxicos de polimixina B [una molécula con alta afinidad para LípidoA] a las composiciones.

Véase el documento WO 01/09350 para más detalle sobre los procedimientos de detoxificación anteriores y para las secuencias de promotor/génicas relevantes y los procedimientos de regulación hacia niveles mayores y regulación hacia niveles menores. Los genes *msbB* y *htrB* de *Neisseria* se llaman también *lpxL1* y *lpxL2*, respectivamente (véase el documento WO 00/026384) y las mutaciones de supresión de estos genes se caracterizan fenotípicamente por el mutante de LOS *msbB*⁻ que pierde una cadena acilo secundaria comparado con el tipo silvestre (y que mantiene la cadena acilo primaria 4 y secundaria 1), y el mutante de LOS *thrB*⁻ que pierde ambas cadenas de acilo secundarias. Dichas mutaciones se combinan preferiblemente con mutaciones para asegurar que la cepa de *Neisseria* de producción es deficiente en polisacárido capsular (véase más arriba) para asegurar la presentación óptima de LOS detoxificados en la vesícula o para ayudar la purificación del LOS de subunidad detoxificada. Véanse los documentos WO 93/14115, WO 95/03327, Velucchi y col., (1997) J. Endotoxin Res. 4: 1 - 12 y el documento EP 976402 para detalles adicionales de equivalentes funcionales de péptidos no tóxicos de polimixina B que se pueden utilizar en las composiciones de esta invención - particularmente el uso del péptido SAEP 2 (de secuencia KTKCKFLKKC donde las dos cisteínas forman un puente disulfuro).

Por "regulación hacia niveles menores de la expresión del producto génico funcional" se entiende que las adiciones, supresiones o sustituciones se realizan al promotor o la fase de lectura abierta del gen en cuestión de manera que la actividad biosintética del producto

débiles, sin embargo más preferiblemente la mayoría o toda la fase de lectura abierta y/o promotor se suprime para asegurar una regulación hacia niveles menores permanente del producto génico (activo) (como se describe en el documento WO 01/09350).

Las mutaciones anteriores son benéficas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) de la cual las composiciones inmunogénicas de vesículas se derivan, particularmente aquellas descritas aquí. Sin embargo, se prefiere el uso de las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica, más preferiblemente menB) del inmunotipo L2 ó L3, típicamente extraídas con un proceso de extracción con bajo % DOC como se describe aquí. Preferiblemente las composiciones inmunogénicas de vesículas de la invención contienen vesículas de ambos L2 y L3, donde al menos una (preferiblemente ambas) se derivan de cepas deficientes en la expresión de los genes anteriores.

Los aspectos adicionales de la invención incluyen las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica o gonocócica o meningocócica B) modificadas genéticamente descritas anteriormente de las que los LOS o preparaciones inmunogénicas de vesículas de la invención se pueden derivar.

Las preparaciones de LOS o de vesículas que contienen LOS de la invención

Un aspecto adicional de la invención son las preparaciones de LOS (particularmente cualquiera de las descritas anteriormente) aisladas de las cepas de *Neisseria* de la invención. Preferiblemente el LOS aislado (o vesícula que contiene LOS) es del inmunotipo L2 o L3 y preferiblemente las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden ambas preparaciones de LOS (o vesícula) L2 y L3 de la invención.

Dichas preparaciones también se pueden mejorar mediante la conjugación de la porción de oligosacárido de los LOS anteriores (si está purificada o presente en una preparación de vesículas) a un portador que comprende una fuente de epítomos de células T (de este modo los LOS obtienen un inmunógeno [T dependiente] incluso mejor). Una preparación de LOS de la invención puede producir alternativamente (o además) un antígeno mejor

El procedimiento de aislamiento de LOS a partir de bacterias se conoce bien en la técnica (véase por ejemplo, el procedimiento de agua - fenol en caliente de Wesphal y Jann [Meth. Carbo. Chem. 1965, 5: 83 - 91]). Véase también Galanos y col., 1969, Eur J. Biochem 9: 245 - 249, y Wu y col., 1987 Anal Bio Chem 160: 281 - 289. Se conocen también las técnicas para conjugar LOS aislado (véase por ejemplo el documento EP 941738 incorporado en esta memoria descriptiva como referencia).

Para los propósitos de esta invención "un portador que comprende una fuente de epítomos de células T" es usualmente un péptido o, preferiblemente, un polipéptido o proteína. Las técnicas de conjugación se conocen bien en la técnica. Los portadores típicos incluyen proteína D de *H. influenzae* no caracterizable, toxoide de tétanos, toxoide de difteria, CRM197 o proteínas de membrana externa presentes en preparaciones de vesícula (particularmente *Neisseria* ó meningocócica).

Las composiciones de LOS aisladas preferidas de la invención son: una composición que comprende LOS L2 y L3 aislados en los que la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un portador que comprende una fuente de epítomos de células T, una composición que comprende LOS L2 ó L3 que tiene una estructura consistente con la que se ha derivado de una cepa meningocócica lgtB⁻ en la que la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un portador que comprende una fuente de epítomos de células T y más preferiblemente una composición que comprende LOS L2 y L3 aislados que tienen una estructura consistente con ellos que se han derivado de una cepa meningocócica lgtB⁻ en las que la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un portador que comprende una fuente de epítomos de células T.

Preferiblemente las composiciones de LOS de la invención se han detoxificado. Esto se puede hacer mediante técnicas conocidas de tratamientos químicos de hidracina o hidrólisis alcalina que retiran las cadenas de acilo de la molécula (pero que pueden reducir la eficacia protectora de la molécula), pero se realiza preferiblemente mediante el aislamiento de LOS de un mutante meningocócico htrB⁻ o msbB⁻ (como se ha descrito anteriormente; particularmente en cepas sin polisacáridos capsulares), o mediante la adición de un equivalente

Los LOS de la invención se puede administrar en un estado aislado (usualmente en forma de micelas si el resto de lípido A está todavía intacto) o se puede administrar en un liposoma. En tal caso las proteínas de membrana externa se pueden añadir al liposoma y los LOS se pueden conjugar intra-liposoma a dichas proteínas de membrana externa para obtener el oligosacárido un antígeno T dependiente. Esto se puede realizar con una química similar a la reticulación de LOS intra-vesículas como se describe más adelante.

Reticulación (conjugación) intra- vesícula de la porción de oligosacárido de LOS a las proteínas de membrana externa presentes en la superficie de la vesícula

Cuando LOS (en particular los LOS de la invención) está presente en una formulación de vesícula el LOS se conjuga preferiblemente *in situ* mediante procedimientos que permiten la conjugación de LOS a una o más proteínas de membrana externa también presentes en la preparación de las vesículas (por ejemplo, PorA o PorB en meningococo).

Así, un aspecto adicional de la invención es una preparación de vesículas de una cepa bacterial Gram-negativa en la membrana externa la cual es integrada a una proteína de membrana externa conjugada a LOS. Aunque LOS puede ser adicionado a una preparación de vesícula para su conjugación, se prefiere que el LOS esté naturalmente presente en la superficie de la preparación de vesícula.

Este procedimiento puede potenciar ventajosamente la estabilidad y/o inmunogenicidad (proporcionando auxiliares de células T) y/o antigenicidad del antígeno LOS dentro de la formulación de vesículas - proporcionando de esta manera auxiliares de células T para el inmunógeno de oligosacárido T-independiente en su conformación más protectora - como LOS en su ambiente natural en la superficie de la membrana externa meningocócica. Además, la conjugación de los LOS dentro de la vesícula puede dar como resultado una detoxificación de los LOS (estando la porción de lípido A establemente enterrada en la membrana externa estando así menos disponible para ocasionar toxicidad). De este modo los procedimientos de detoxificación mencionados anteriormente de aislamiento de vesículas a

añadir en combinación para la seguridad adicional). Las preparaciones de vesículas conjugadas de la invención son típicamente de forma tal que la toxicidad de LOS en la vesícula se reduce comparado con la misma vesícula con la misma cantidad de LOS totalmente sin conjugar. La toxicidad de LOS puede ser fácilmente determinada por la persona entrenada, por ejemplo, usando el ensayo de pirogenicidad de LOS en conejos de la Farmacopea Europea (ver ejemplo 7).

Las preparaciones de vesículas conjugadas de la invención son ventajosamente de forma tal que los conjugados tiene una conformación adecuada para producir una respuesta inmune en un hospedador, el suero del cual es reactivo (puede unirse) con los no conjugados preferiblemente presentes en la bacteria de la cual fue hecha la preparación de vesícula, y más preferiblemente en una forma bactericida en un ensayo SBA.

Donde las vesículas de *Neisseria* están conjugadas con LOS y las vesículas son derivadas de una cepa regulada para baja expresión en una o más proteínas de membrana externa inmunodominantes como se describe aquí, se prefiere que si PorA es regulado para bajos niveles de expresión, PorB no esté regulado para bajos niveles de expresión y viceversa. Esto permite la reticulación de la mayoría de LOS con una proteína mayor de membrana externa y así minimiza cualquier efecto de conjugación en antígenos de membrana externa menor de protección cruzada presentes en la vesícula.

De este modo los inventores han encontrado que una composición que comprende vesículas en la que LOS presente en las vesículas se ha conjugado con una forma intra-vesícula a las proteínas de membrana externa también presentes en la vesícula puede formar la base de una vacuna para el tratamiento o prevención de enfermedades ocasionadas por el organismo a partir del cual se han derivado las vesículas, siendo dicha vacuna sustancialmente no tóxica y es capaz de inducir una respuesta bactericida T dependiente contra LOS en su ambiente nativo.

Por lo tanto esta invención proporciona además una preparación de vesículas

misma vesícula. Preferiblemente las vesículas se han derivado de cualquier organismo Gram negativo a partir de las que se pueden producir las vesículas (véase el documento WO 01/09350), preferiblemente *Moxarella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* no caracterizable o *Neisseria* (más preferiblemente meningococo).

Dichas preparaciones de vesículas se pueden aislar a partir de la bacteria en cuestión (véase el documento WO 01/09350) y después se somete a procedimientos químicos de conjugación conocidos a grupos de unión (por ejemplo, NH_2 o COOH) en la porción de oligosacárido de LOS a grupos (por ejemplo, NH_2 o COOH) en las proteínas de membrana externa de la vesícula. Se pueden usar las técnicas de reticulación que utilizan glutaraldehído, formaldehído o mezclas de glutaraldehído/formaldehído, pero se prefiere que se usen las técnicas químicas más selectivas tales como EDAC o EDAC/NHS (J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hidroxisuccinimide of water soluble carbodiimide - mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220 - 222 (1986); y Bioconjugates Techniques : GregT. Hermanson (1996) pp. 173 - 176). Otras técnicas químicas de conjugación o tratamientos capaces de crear enlaces covalentes entre LOS y moléculas de proteínas que se podrían usar se describen en el documento EP 941738.

Preferiblemente las preparaciones de vesículas se conjugan en ausencia de polisacárido capsular. Las vesículas se pueden aislar a partir de una cepa que no produce polisacárido capsular (naturalmente o mediante mutación), o se pueden purificar a partir de la mayoría (más de 60, 70, 80, 90, ó 99% removidos) y preferiblemente todos los polisacáridos capsulares contaminantes. De esta forma, la reacción de conjugación de LOS intra-vesícula es mucho más eficaz.

Preferiblemente más que 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ó 95% de LOS presentes en las vesículas está reticulados/conjugados.

Preferiblemente las vesículas de la invención se han preparado de manera tal que el contenido de LOS en las vesículas es 3-30, 5-25, 10-25, 15-22 y más preferiblemente alrededor de o exactamente 20% contenido de LOS medido por tinción de plata después de electroforésis SDS PAGE usando LOS purificado como estándar (ver método de Tsai, J. Biol. Standardization

unidas pero conforma la mayoría del antígeno.

Cuando las vesículas conjugadas intra-vesícula se derivan de meningococo, se prefiere que la cepa a partir de la cual se derivan sea un mutante que no puede producir polisacárido capsular (por ejemplo, una de las cepas de mutantes descritas anteriormente, en particular siaD). También se prefiere que las composiciones inmunogénicas eficaces contra la enfermedad meningocócica comprendan tanto una vesícula L2 como L3, en las que LOS L2 y L3 se conjugan ambos con las proteínas de membrana externa de las vesículas. Además, se prefiere que la estructura LOS dentro de la vesícula conjugada intra-vesícula sea consistente con la que se ha derivado de una cepa meningocócica lgtB⁻. Más preferiblemente composiciones inmunogénicas comprenden vesículas conjugadas intra-vesícula: derivadas de una cepa meningocócica mutante L2 ó L3 que no puede producir polisacárido capsular y es lgtB⁻; comprendiendo vesículas de L2 y L3 derivadas de cepas meningocócicas mutantes que no pueden producir polisacárido capsular; comprendiendo vesículas de L2 y L3 derivadas de cepas meningocócicas mutantes que son lgtB⁻; o más preferiblemente comprendiendo vesículas de L2 y L3 derivadas de cepas meningocócicas mutantes que no pueden producir polisacárido capsular y son lgtB⁻.

La típica cepa meningocócica L3 que se puede usar en la presente invención es la cepa H44/76 menB. Una cepa típica de L2 es la B16B6 menB o la cepa meningocócica 39E tipo C o la cepa 760676.

Como se ha indicado anteriormente las vesículas de la invención se han detoxificado a un grado mediante el acto de conjugación y no necesitan detoxificarse posteriormente, sin embargo para seguridad adicional se puede utilizar procedimientos adicionales de detoxificación, por ejemplo usando vesículas derivadas de una cepa meningocócica que es htrB⁻ o msbB⁻ o añadiendo un equivalente péptido funcional no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad a Lípido A] (preferiblemente SEAP 2) a la composición de vesículas (como se ha descrito anteriormente). La conjugación de LOS (particularmente en una manera intra-vesícula) muestra de este modo sorprendentemente una menor toxicidad de

meningocócicas) se proporciona adicionalmente por medios de conjugación intra-vesícula de LOS a la proteína de membrana externa de las vesículas.

En la anterior forma se proporcionan las vesículas meningocócicas y composiciones inmunogénicas que comprenden vesículas que tienen como un LOS de antígeno importante que es sustancialmente no tóxico, desprovisto de problemas de autoinmunidad, tiene un carácter T-dependiente, está presente en su ambiente natural y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo bactericida contra más del 90% de cepas meningocócicas (en el caso de composiciones de L2 + L3).

Uno o más de polisacáridos capsulares de Men A, C, Y o W u oligosacáridos (preferiblemente al menos MenC, o MenA y MenC, o Men C y MenY) se pueden también conjugar en una proteína de membrana externa de la vesícula de la invención. Aunque esto se podría hacer en la misma reacción como reticulación de LOS, se prefiere que se haga en una reacción separada (preferiblemente posterior).

El procedimiento de conjugación de LOS intra-vesícula óptimo es un aspecto adicional de la presente invención. Dicho procedimiento incorpora los pasos de aislar las vesículas de una bacteria Gram negativa (preferiblemente usando un bajo porcentaje de DOC), llevando a cabo química adecuada para conjugar LOS (preferiblemente vía su porción oligosacárido) presente en las vesículas a una proteína de membrana externa presente en la misma vesícula, aislar la preparación de vesícula conjugada intra-vesícula, y, opcionalmente formular la preparación de vesícula conjugada intra-vesícula con una preparación de vesícula conjugada intra-vesícula realizada por el mismo proceso pero teniendo un inmunotipo LOS diferente (preferiblemente mezclando vesículas L2 y L3 de *Neisseria/meningococo*) y/o formulando la preparación de vesícula con un excipiente farmacéuticamente aceptable para hacer una composición de vacuna.

La conjugación intra-vesícula debe incorporar 1, 2 ó 3 de las siguientes etapas de procedimiento: el pH de la conjugación debe ser mayor que pH 7,0, preferiblemente mayor o igual que pH 7,5 (más preferiblemente inferior a pH 9); condiciones de 1 - 5% preferiblemente

de 0,1 M, 0,05 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,001 M y más preferiblemente no presente en absoluto. Todas estas características del procedimiento aseguran que las vesículas permanezcan estables y en solución durante todo el procedimiento de conjugación.

El procedimiento de conjugación EDAC/NHS es un procedimiento preferido para la conjugación intra-vesícula. EDAC/NHS se prefiere a formaldehído que puede reticular en una extensión demasiado alta, y de este modo afectar adversamente a la filtrabilidad. EDAC reacciona con ácidos carboxílicos (como son KDO en LOS) para crear un intermedio éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina (como son lisinas en las proteínas de membrana externa como es PorB), se forma un enlace de amida con liberación de un subproducto de isourea. Sin embargo, la eficacia de una reacción mediada por EDAC se puede incrementar mediante la formación de un intermedio de éster Sulfo-NHS. El éster de Sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más tiempo que el éster activo formado a partir de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De este modo rendimientos más altos de la formación de enlace de amida se pueden realizar usando este procedimiento en dos etapas. La conjugación de EDAC/NHS se describe en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220 - 222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173 - 176. Preferiblemente se usa en la reacción 0,01 - 5 mg de EDAC por mg de vesícula, preferiblemente 0,05 - 1 mg de EDAC por mg de vesícula. La cantidad de EDAC usada depende de la cantidad de LOS presente en la muestra que a su vez depende del porcentaje de DOC usado para extraer las vesículas. A bajo porcentaje de DOC (por ejemplo 0,1%), se usan altas cantidades de EDAC (1 mg/mg y más), sin embargo a alto porcentaje de DOC (por ejemplo 0,5%), se utilizan menos cantidades de EDAC (0,05 - 0,1 mg/mg) para evitar demasiada reticulación inter-vesículas.

Por lo tanto, un procedimiento preferido de la invención es un procedimiento para producir LOS conjugado a intra-vesícula (preferiblemente meningocócica) que comprende las etapas conjugar vesículas en presencia de EDAC/NHS a un pH entre 7,0 y pH 9,0 (preferiblemente alrededor de pH 7,5) en 1 - 5% (preferiblemente alrededor 3%) de

A la reacción puede seguir geles de separación de Western de la mezcla de reacción usando anti-LOS (por ejemplo, anti-L2 o anti L3) mAbs para mostrar el incremento de peso molecular de LOS para una mayor proporción de LOS en las vesículas a medida que transcurre el tiempo de reacción.

Se pueden recuperar 99% de vesículas usando dichas técnicas.

Se encontró que EDAC es un agente de reticulación intra-vesículas excelente porque retículo LOS a OMP suficientemente para mejorar la inmunogenicidad T-dependiente de LOS, pero no lo retículo a tan alto grado para producir problemas tales como escasa filtrabilidad, agregación y reticulación inter-vesícula. La morfología de las vesículas generadas es similar a la de las vesículas no conjugadas (por microscopia electrónica). Además, el protocolo anterior evitaba que tuviese lugar una reticulación demasiado alta (que puede disminuir la inmunogenicidad de las OMP protectoras presentes naturalmente en la superficie de la vesícula por ejemplo TbpA o Hsf).

Técnicas para aislar vesículas

Las vesículas de membrana externa (abreviadamente OMV o vesículas) se pueden aislar mediante muchas técnicas conocidas (Fredriksen y col., NIPH Annals (1991), 14, 67 - 79; Zollinger y col., J. Clin Invest (1979), 63, 836 - 848; Saunders y col., Infect Immun (1999), 67, 113-119; J. J. Drabick y col., Vaccine (1999), 18, 160 - 172). Éstos se dividen en dos grupos principales de técnicas que usan desoxicolato (alrededor de 0,5%) para extraer vesículas de meningococo y técnicas que usan bajos niveles de desoxicolato (abreviadamente DOC) o nada de desoxicolato en absoluto. El DOC libre que produce vesículas tiene la característica interesante de mantener alto nivel de LOS en las OMV que es ventajoso en una vacuna donde LOS es un antígeno protector. Comparadas con las vesículas extraídas con DOC la concentración de L3 Ags en OMV obtenida mediante un procedimiento exento de DOC es aproximadamente diez veces más alta. Por esta razón se prefiere un procedimiento exento de detergente (preferiblemente exento de DOC) de generación de vesículas para los propósitos de los procedimientos de esta invención, aunque

estrechamente en la vesícula mientras que elimina cualquier LOS más tóxico débilmente retenido. Típicamente 0 - 0,5% y preferiblemente 0,02 - 0,4%, 0,04 3% ó 0,06 - 2% de detergente (preferiblemente DOC) se utiliza para la extracción de vesículas, más preferiblemente 0,08 - 0,15% y más preferiblemente alrededor de o exactamente 0,1% se utiliza para obtener una cantidad óptima de LOS para estar establemente presente en las vesículas.

Los procedimientos de extracción exentos de DOC (o bajos en DOC) se prefieren particularmente cuando los LOS se han detoxificado mediante uno o más de los procedimientos detallados anteriormente.

Se prefiere que los contenidos de LOS de las vesículas en todas las realizaciones de la presente invención sea 3-30, 5-25, 10-25, 15-22 y más preferiblemente alrededor de o exactamente 20% contenido de LOS medido por tinción de plata después de electroforesis SDS-PAGE usando LOS purificado como estándar (ver método de Tsai, J. Biol. Standarization (1986) 14:25-33). Usando Nmen L3 LOS como estándar en este método, en general el contenido de LOS en las vesículas del inmunotipo L3 de Nmen extraídos con 0,1% de DOC es de alrededor del 20% de LOS, con 0,2% DOC es alrededor de 15% de LOS, con 0,3% de DOC es alrededor de 10% de LOS y con 0,5% de DOC es alrededor del 5% de LOS.

Composiciones de vacunas

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden formular fácilmente en forma de composiciones de vacunas mediante la adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un procedimiento para fabricar las composiciones inmunogénicas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica) o vacunas de la invención se proporciona adicionalmente comprendiendo las etapas de aislar LOS purificados de la invención (preferiblemente L2 o L3) como se ha descrito anteriormente o producir vesículas aisladas de la invención (preferiblemente con un inmunotipo L2 o L3) como se ha descrito anteriormente y formular los

L2 y L3 de la invención, o un LOS purificado de L2 y una vesícula de L3 (o viceversa), se combinan en una etapa de mezcla. Preferiblemente los LOS purificados o vesícula de la invención se han conjugado como se ha descrito anteriormente después del aislamiento. También se puede añadir una etapa adicional de formulación de liposomas para los LOS purificados (usando técnicas conocidas en la técnica, véase por ejemplo el documento WO 96/40063 y referencias citadas en esta memoria descriptiva). Preferiblemente las preparaciones de vesículas se aíslan mediante extracción con concentraciones bajas (o sin) de DOC (como se ha descrito anteriormente).

Dichos procedimientos de combinación de L2 y L3 pueden producir una vacuna que es eficaz contra casi todas las cepas de meningococos B.

Las composiciones inmunogénicas anteriores (o procedimientos) pueden tener añadidos uno o más (2, 3 ó 4) polisacáridos u oligosacáridos meningocócicos (bien puros o conjugados a un portador que comprende epítomos de células T, como se ha descrito anteriormente) de serogrupos A, C, Y o W a la composición. Preferiblemente al menos se añade C (más preferiblemente conjugado) y más preferiblemente A y C o Y y C (preferiblemente todos conjugados) y más preferiblemente A, C, Y y W (preferiblemente todos conjugados). Ventajosamente un polisacárido u oligosacárido capsular B de *H. influenzae* también se incluye en las composiciones anteriores para generar una vacuna de meningitis universal.

Preferiblemente las composiciones que consisten en o que comprenden composiciones específicamente individualizadas en el documento WO 94/08021 no se reivindican en la presente invención.

Formulaciones de vacunas de la invención

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden formular con un adyuvante adecuado para generar composiciones de vacunas de la invención.

Los adyuvantes adecuados comprenden una sal de aluminio tal como gel hidróxido de aluminio (abreviadamente alum) o fosfato de aluminio (preferiblemente hidróxido de aluminio), pero también puede ser una sal de calcio (particularmente carbonato cálcico), hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados.

Los sistemas adyuvantes adecuados de Th1 que se pueden añadir incluyen lípido A monofosforilo, particularmente lípido A monofosforilo de 3-de-O-acilado (u otros derivados de LOS no tóxicos) y una combinación de lípido A monofosforilo, preferiblemente lípido A monofosforilo de 3-de-O-acilado (abreviadamente 3D-MPL) [o derivados de LOS no tóxicos] junto con una sal de aluminio (preferiblemente fosfato de aluminio. Un sistema potenciado implica la combinación de un lípido A monofosforilo y un derivado de saponina particularmente la combinación de QS21 [u otra saponina] y 3D-MPL [o un derivado de LOS no tóxico] como se describe en el documento WO 94/00153 o una composición menos reactogénica donde la QS21 [o saponina] se inactiva con colesterol como se describe en el documento WO96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO95/17210 y es una formulación preferida que también puede añadirse. Otros adyuvantes que también se pueden añadir comprenden una saponina, más preferiblemente QS21 y/o una emulsión de aceite en agua y tocoferol. También se puede añadir oligonucleótidos que contienen CpG sin metilar (documento WO 96/02555).

La preparación de vacunas se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. y Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York).

Una dosis inmunoprotectora de vacunas se puede administrar mediante la vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir las vías de inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante la administración a la mucosa a los tractos oral/alimentario (preferiblemente administración intranasal), respiratoria, genitourinaria. Típicamente la cantidad de vesícula en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del tipo de inmunógeno específico utilizado y como se presenta. Generalmente se espera que cada dosis comprenderá 1 - 100 μg de cada vesícula, preferiblemente 5 - 50 μg y más típicamente en el intervalo 5-25 μg .

Mejoras adicionales a las composiciones inmunogénicas de las vesículas de la invención

Las composiciones de vesículas anteriores de la invención se pueden mejorar

meningitidis B) tienen uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) regulados hacia niveles mayores mediante la inserción de copias adicionales del gen en el genoma, o introduciendo un promotor más fuerte hacia arriba del gen existente, o cualquiera de las otras formas descritas en el documento WO 01/09350 que son capaces de inducir cepas modificadas para fabricar sobre 1,2, 1,5, 2, 3, 5 ó 10 veces el nivel de antígeno comparado con la cepa no modificada: NspA (documento WO 96/29412), Hsf o truncados de los mismos (documentos WO 99/31132 y WO 01/55182; también conocido como NhhA), Hap (documento PCT/E99/02766) OMP85 (documento WO 00/23595, PilQ (documento PCT/E99/03603), PldA (documento PCT/EP99/03603), FrpB (documento WO 96/31618), TbpA (documentos WO92/03467, US59112336, WO93/06861 y EP586266), TbpB (documentos WO93/06861 y EP586266), NadA (Comanducci y col., J. Exp. Med 2002 195: 1445 - 1454), FrpA/FrpC o porciones en común entre estos antígenos que implican 5 o más secuencias repetidas (documento WO 92/01460; Thompson y col., (1993) J. Bacteriol. 175: 811 - 818; Thompson (1993) Infect. Immun. 61: 2906 - 2911), LbpA, LbpB (documento PCT/EP98/05117), FhaB (documento WO98/02547 SEC ID N° 38 [nucleótidos 3083 - 9025]), HasR (documento PCT/EP99/05989), lipo02 (documento PCT/EP99/08315), Tbp2 (documento WO 99/57280), MltA (documento WO 99/57280), TspA (documento WO 00/03003), TspB (documento WO 00/03003) y ctrA (documento PCT/EP00/00135), MafA (NMB 0652), MafB (NMB0643), Omp26 (NMB 0181), Adhesin X (NMB0315), Adhesin Y (NMB0995), Adhesin Z (NMB 1119), y OstA (NMB 0280). Ejemplos de secuencias de NMB se pueden encontrar en la base de datos www.neisseira.org. Donde Hsf se menciona en esta memoria descriptiva, el término puede ser sustituible en cada caso por truncados de Hsf, en particular los descritos en WO 01/55182.

Se prefiere particularmente si tanto Hsf como TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos [documento EP 586266], o Hsf y OMP85, u OMP85 y TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos), o NspA y Hsf, o NspA y OMP85, o NspA y TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos) están ambos regulados hacia niveles mayores. Donde 2 vesículas están comprendidas en la composición, se prefiere que cada vesícula tenga diferentes regulaciones hacia niveles mayores. Si TbpA alto y bajo se van a regular hacia niveles mayores, se prefiere que estos regulan hacia niveles

tienen inmunotipos de LOS L2 y L3. TbpA se puede regular hacia niveles mayores genéticamente o mediante desarrollo de las cepas de producción de *Neisseria/meningocócica* en condiciones limitadas de hierro por ejemplo en presencia de 50 - 70 μ M de Desferal (mesilato de deferoxamina), disponible de Sigma). Si se toma el último planteamiento, se prefiere que el gen de expresión de FrpB se regule hacia niveles menores (preferiblemente suprimido) ya que este antígeno variable puede hacerse inmunodominante en vesículas aisladas de cepas meningocócicas aisladas en condiciones limitadas de hierro.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende una vesícula de L3 de una cepa de un *msbB*⁻ de polisacárido capsular de *IgtB*⁻ preferiblemente regulado hacia niveles mayores en TbpA alto y Hsf y una vesícula de L2 de una cepa *msbB*⁻ de polisacárido capsular de *IgtB*⁻ preferiblemente regulado hacia niveles mayores en TbpA bajo y Omp85. Más preferiblemente ambas vesículas están adicionalmente reguladas hacia niveles menores de expresión de PorA y/o FrpB y opcionalmente la expresión de OpC y/o OpA. Las vesículas se aíslan más preferiblemente mediante un procedimiento de DOC bajo como se ha descrito anteriormente y el LOS en ambas vesículas está reticulado intra-vesícula a la proteína de membrana externa.

Vacunas de células fantasma o enteras muertas

Los inventores contemplan que las composiciones y vacunas anteriores concernientes a las vesículas se pueden fácilmente extender a procedimientos que conciernen a las preparaciones y vacunas de células fantasmas o enteras muertas (con idénticas ventajas) Los procedimientos para fabricar preparaciones fantasma (células vacías con envolturas intactas) de cepas Gram negativas se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo el documento WO 92/01791). Los procedimientos para matar células enteras para fabricar preparaciones de células inactivadas para uso en vacunas también se conocen bien. Por lo tanto las composiciones y vacunas que implican vesículas descritas en todo este documento se contemplan para ser aplicables a las mismas composiciones o vacunas que comprenden preparaciones equivalentes de células fantasma y enteras muertas de la invención.

El ensayo bactericida en suero es el procedimiento preferido para valorar relaciones sinérgicas entre antígenos cuando se combinan en una composición inmunogénica de la invención.

Tal respuesta sinérgica se puede caracterizar mediante el SBA provocado por la combinación de antígenos que son al menos 50%, dos veces, tres veces preferiblemente cuatro veces, cinco veces, seis veces siete veces, ocho veces, nueve veces y más preferiblemente diez veces más alto que el SBA provocado por cada antígeno separadamente. Preferiblemente SBA se mide contra una cepa homologa de la que se derivan los antígenos y preferiblemente también contra un panel de cepas heterólogas. (Véase más adelante para un panel representativo por ejemplo BZ10 (B:2b:P1,2) que pertenecen al grupo A-4; B16B6 (B2a:P1,2) perteneciente al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1,7, 16)). SBA es el marcador inmunológico comúnmente acordado para estimar la eficacia de una vacuna meningocócica (Perkins y col., J. Infect Dis. 1998, 177: 683-691). SBA se puede averiguar satisfactoriamente mediante cualquier procedimiento conocido. SBA se puede llevar a cabo usando sueros obtenidos de modelos de animales o de sujetos humanos.

Un procedimiento preferido para conducir SBA con sueros humanos es el siguiente. Se toma una muestra de sangre antes a la primera vacunación, dos meses después de la segunda vacunación y un mes después de la tercera vacunación (tres vacunaciones en un año siendo un programa de vacunación humana primaria administrada en, por ejemplo, 0, 2 y 4 meses, ó 0, 1 y 6 meses. Tales programas de vacunación humana primaria se pueden llevar a cabo en niños de un año de edad (por ejemplo al mismo tiempo como se llevan a cabo las vacunaciones con Hib) o de 2 - 4 años de edad o adolescentes también se pueden vacunar para el SBA de ensayo con dicho programa de vacunación primaria. Una muestra adicional de sangre se puede tomar 6 a 12 meses después de la vacunación primaria y un mes después de la dosis de refuerzo, si es aplicable.

SBA será satisfactorio para un antígeno o preparación de vesículas con actividad bactericida homologa si un mes después de la tercera dosis vacuna (del programa de vacunación primaria) (en niños de 2 - 4 años de edad o adolescentes, pero preferiblemente

prevacunación) contra la cepa de meningococo de la que los antígenos de la invención se derivaban es mayor que 30%, preferiblemente mayor que 40%, más preferiblemente mayor que 50% y más preferiblemente mayor que el 60% de los sujetos.

Ciertamente un antígeno o preparación de vesículas con actividad bactericida heteróloga también puede constituir preparación de vesículas con actividad bactericida homologa si puede también provocar SBA satisfactoria contra la cepa meningocócica de la que se deriva.

SBA será satisfactorio para un antígeno o preparación de vesículas con actividad bactericida heteróloga si un mes después de la tercera dosis de vacuna (del programa de vacunación primaria) (en niños de 2 - 4 años de edad o adolescentes, pero preferiblemente en niños en el primer año de vida) el porcentaje de sujetos con un crecimiento cuatro veces en términos de título de SBA (dilución de anticuerpo) (comparado con el título de prevacunación) contra tres cepas heterólogas de meningococo es mayor que 20%, preferiblemente mayor que 30%, más preferiblemente mayor que 35% y más preferiblemente mayor que 40% de los sujetos. Tal ensayo es una buena indicación de si el antígeno o preparación de vesículas con actividad bactericida heteróloga puede inducir anticuerpos bactericidas cruzados contra diversas cepas meningocócicas. Las tres cepas heterólogas deben preferiblemente tener complejo de tipo electroforético (abreviadamente ET) o configuración de tipo de secuencias multilocus (abreviadamente MLST) (véase Maiden y col., PNAS Estados Unidos 1998, 95: 3140 - 5) a cada otra y preferiblemente a la cepa de la que el antígeno o preparación de vesículas con actividad bactericida heteróloga se fabrica o deriva. Una persona experta será capaz de determinar fácilmente tres cepas con complejo ET diferente que reflejan la diversidad genética observada entre meningococos, particularmente entre cepas de meningococo de tipo B que se reconocen que son la causa de la carga de enfermedad significativa y/o que representan líneas hipervirulentas de MenB reconocidas (véase Maiden anteriormente). Por ejemplo tres cepas que se podrían utilizar son las siguientes: BZ10 (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) perteneciente al complejo ET-5, o cualquiera otra cepa perteneciente al mismo grupo ET. Dichas cepas se pueden usar para ensayar un antígeno o preparación de vesículas con actividad bactericida heteróloga fabricada o

Otra cepa de muestra que se podría utilizar es del clon epidémico de la línea 3 (por ejemplo NZ124 [B:4:P1,7, 4]. Otra cepa de ET-37 es NGP165 (B:2a:P1,2).

Los procedimientos para medir la actividad de SBA se conocen en la técnica.

Por ejemplo un procedimiento que podría usarse se describe en el documento WO 99/09176 en el ejemplo 10C. En términos generales, un cultivo de la cepa a ensayarse se desarrolla (preferiblemente en condiciones de supresión de hierro mediante adición de un agente quelante de hierro tal como EDDA al medio de crecimiento) en la fase logarítmica de crecimiento. Esto se puede suspender en un medio con BSA (tal como medio de Hanks con BSA al 0,3%) con el fin de obtener una suspensión de células de trabajo ajustada a aproximadamente 20000 UFC/ml. Una serie de mezclas de reacción se pueden preparar mezclando una serie de diluciones dos veces de sueros a ensayarse (preferiblemente inactivados por calor a 56°C durante 30 minutos) [por ejemplo en un volumen de 50 µl/pocillo] y la suspensión a ensayarse de la cepa meningocócica de 20000 UFC/ml [por ejemplo en un volumen de 25 µl/pocillo]. Los viales de la reacción se deben incubar (por ejemplo 37°C durante 15 minutos) y agitarse (por ejemplo a 210 rpm). La mezcla final de reacción [por ejemplo en un volumen de 100 µl] adicionalmente contiene una fuente de complemento [tal como 25% de volumen final de suero de conejo pequeño preensayado, o suero humano para serología humana] y se incuba como antes [por ejemplo 37°C durante 60 minutos]. Se puede usar para este ensayo una placa de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos de poliestireno estéril. Una alícuota [por ejemplo 10 µl] se puede tomar de cada pocillo usando una pipeta multicanal y gotearse en placas de agar de Mueller - Hinton (conteniendo preferiblemente 1% de Isovitalex y 1% de suero de caballo inactivado por calor) e incubadas (por ejemplo durante 18 horas a 37°C en CO₂ al 5%). Preferiblemente, se pueden contar colonias individuales hasta 80 UFC por alícuota. Las siguientes tres muestras de ensayo se pueden utilizar como controles: tampón + bacterias + complemento; tampón + bacterias + complemento inactivado; suero + bacterias + complemento inactivado. Los títulos de SBA se pueden calcular sencillamente usando un programa que procesa los datos para dar una medida de la dilución que corresponde al 50% de muerte celular mediante un cálculo de

de la patente se incorporan como referencia en esta memoria descriptiva.

EJEMPLOS

Los ejemplos citados más adelante se llevan a cabo usando técnicas convencionales, que se conocen bien y rutinariamente por los expertos en la técnica, excepto donde de otra manera se describe en detalle. Los ejemplos son ilustrativos pero no limitan la invención.

Ejemplo 1

Los ejemplos describen genes de supresiones que codifican proteínas implicadas en la producción de polisacáridos capsulares B de meningococo B, la supresión del gen PorA, la regulación hacia niveles mayores de diversas proteínas de membrana externa en la superficie de vesículas meningocócicas, la regulación hacia niveles menores de proteínas inmunodominantes o enzimas biosintéticas y procedimientos para aislar vesículas se describen en el documento WO 01/09350.

Ejemplo 2: LOS: un antígeno protector cruzado clave

Para valorar el papel de LOS como un antígeno protector cruzado potencial, cepa de meningococo B H44/76 de tipo salvaje (abreviadamente WT) (que expresa LOS L3) y una cepa H44/76 modificada que expresa un "LOS de tipo galE" (con una estructura corta como para un LOS IgtE⁻) se usaron para producir vesículas según dos procedimientos diferentes. El primer procedimiento usaba 0,1% de DOC con el fin de tener altos niveles de LOS en vesículas, el segundo usaba 0,5% de DOC para tener bajos niveles de LOS en las vesículas resultantes.

Los ratones recibieron tres inyecciones (el día 0, 21 y 28) por vía IM de 5 µg de vesículas adsorbidas en sales de Al³⁺ (fosfato de aluminio) y 3D-MPL por dosis. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la tercera inyección.

ELISA de LOS anti-L3 se realizó en suero combinado y usando LOS L3 purificado. Los resultados en la figura 3A muestran claramente que el procedimiento con 1% de DOC

0,5% de DOC extraía demasiado LOS con el fin para él de actuar como un antígeno clave en la vacuna de vesículas.

Ensayos bactericidas de suero

SBA se realizó en sueros individuales usando diferentes cepas de NmenB: la cepa WT H44/76 homologa, una cepa PorA(-) H44/76 y dos cepas heterólogas (basadas en subtipo suero) Cu385 y NZ124. Estas cuatro cepas expresan un LOS L3. Se añade una quinta cepa. Comparada con H44/76, esta cepa (B16B6) es heteróloga no solamente para PorA sino también para LOS (es una cepa de inmunotipo L2).

Los resultados en la figura 3B indican una respuesta bactericida cruzada solamente contra cepas L3 pero solamente con las vesículas de 0,1% de DOC WT. No se observó respuesta bactericida cruzada para vesículas gal E⁻ de 0,1% de DOC y vesículas WT de 0,5% de DOC. Además, se conoce bien que la respuesta bactericida inducida por anticuerpos PorA es serotipo dependiente. Esto también se observó en esta experimento con bien vesículas WT de 0,5% de DOC o vesículas de galE⁻ y también con datos de SBA hechos con la cepa PorA(-) H44/76.

Todos estos resultados sugieren que la respuesta bactericida cruzada inducida por vesículas que contienen alto porcentaje de LOS L3 se debe a la producción de Abs dirigida contra el antígeno LOS.

Solamente el LOS L3 (y no el LOS galE⁻) es capaz de provocar la producción de anticuerpos bactericidas. Aunque, en ELISA se observó una buena respuesta anti - LOS con vesículas galE⁻ de 0,1% de DOC, esta respuesta no es biológicamente relevante (no SBA). Además parece también que la respuesta es específica de inmunotipo de LOS como Abs LOS anti-L3 matan solamente las cepas L3 pero no las cepas L2, indicando que una vacuna óptima debe contener idealmente LOS L3 y L2 para cobertura óptima.

Experimento de supresión

Con el fin de demostrar que la respuesta inducida por vesículas WT de DOC al 0,1% se debe principalmente a los anticuerpos anti-LOS, combinaciones de suero se

Los resultados obtenidos (véase la figura 3C) con sueros activados contra vesículas WT de 0,1% de DOC muestran una clara inhibición de dosis - intervalo, demostrando que la mayoría de los anticuerpos inducidos por esta preparación se dirigen contra LOS (confirmando los resultados de SBA generados con la cepa PorA(-) H44/76. En contraste, la respuesta inducida por WT 0,5% de DOC no se dirige contra LOS como se demuestra por SBA hecho con la cepa PorA(-) H44/76 y también indicada por agotamiento de LOS.

Este resultado se mantiene probablemente para LOS L2.

Ejemplo 3: Experimentos con vesículas de L3 e intermedio (*lgtB*⁻) exentas de DOC (LOS no detoxificado) inducía anticuerpos bactericida cruzada

La cepa derivada de meningococos MC58 usada es B:P1,7,16, *opc*⁻, *siaD*⁻. Esta cepa se modificó genéticamente para expresar bien L3 (cepa 2G2) o un epítipo intermedio (cepa 2G EcoN1b-1, como 2G2 pero adicionalmente *lgtB*⁻) o un LOS en versión corta (cepa C6, que es *lgtE*⁻). OMV se produjeron según bien un procedimiento de DOC (0,5%) de altura normal o procedimiento exento de DOC.

Se inmunizaron ratones (10 por grupo) tres veces mediante la vía intramuscular el día 0, 20 y 28. Recibían 1 ó 10 µg (contenido en proteína) de vesículas formuladas en Al(OH)₃. Se tomaron muestras de sangre el día 28 (posición II) y día 42 (posición III).

Se hicieron ensayos bactericidas en sueros combinados y utilizando cepas homologas (MC58 y H44/76) y dos cepas heterólogas (M97250687 y M9725078) con suero de conejo pequeño como fuente de complemento exógeno.

La siguiente tabla resume los resultados (títulos bactericidas para 50% de muerte):

Antígeno	Muestras de sangre	Cepa y serotipo			
		MC58 P1,7,16	H44/76TT P1,7,16	M97250687 P1.19.15	M97252078 P1.A
c6 no doc 10 µg IM	Posición II	>2560	>2560	>2560	98
c6 no doc 10 µg IM	Posición III	1353	>2560	>2560	90
c6 no doc 1 µg IM	Posición II	247	620	247	< 20
c6 no doc 1 µg IM	Posición III	411	878	748	<20
2g2 no doc 10 µg IM	Posición II	> 320	>2560	>2560	>2560
2g2 no doc 10 µg IM	Posición III	>2560	>2560	>2560	1407
2g2 no doc 1 µg IM	Posición II	>2560	>2560	>2560	119
2g2 no doc 1 µg IM	Posición III	> 2560	> 2560	> 2560	348
2gecoN 1b-1no doc 10 µg IM	Posición II	>2560	>2560	>2560	1162
2gecoN 1b-1no doc 10 µg IM	Posición III	>2560	>2560	>2560	1213
2gecoN 1b-1no doc 1 µg IM	Posición II	1151	>2560	1696	22
2gecoN 1b-1no doc 1 µg IM	Posición III	2220	>2560	1947	135
c6 doc 10 µg IM	Posición II	308	248	341	<20
c6 doc 10 µg IM	Posición III	189	104	400	<20
c6 doc 1 µg IM	Posición II	33	43	63	<20
c6 doc 1 µg IM	Posición III	NC (> 20)	24	156	<20
2g2doc10µgIM	Posición II	NC (> 20)	25	360	<20
2g2doc10µgIM	Posición III	201	<20	647	<20
2g2 doc 1 µg IM	Posición II	275	<20	299/644	<20
2g2 doc 1 µg IM	Posición III	237	<20	728	<20
2gecoN 1b-1doc 10 µg IM	Posición II	573	31	685	<20
2gecoN 1b-1doc 10 µg IM	Posición III	NC (> 40)	21	1140	<20
2gecoN 1b-1doc 1 µg IM	Posición II	261	NC	118	<20
2gecoN 1b-1doc 1 µg IM	Posición III	348	NC	692	<20

Claramente la presencia de L3 (2g2) o epítipo intermedio (2 gecon 1 b-1) induce anticuerpos bactericidas cruzados, mientras las vesículas de la cepa LOS truncada (C6) induce un nivel inferior de anticuerpos de reacción cruzados. Esto se ilustraba particularmente cuando se inyectó 1µg de OMV.

Además, como se muestra con OMV purificadas con DOC, reduciendo el contenido de LPS de las vesículas se reduce la inducción de anticuerpos bactericidas cruzados. Aparte de LPS aumentado, es posible que vesículas exentas de DOC puedan retener

Ejemplo 4: Reticulación intra vesículas de LOS L3 y proteína de membrana externa

Las vesículas de MenB utilizadas se derivan de un a cepa H44/76 (LOS de inmunotipo de L3) que era SiaD⁻ (de este modo no expresando polisacárido capsular) y PorA⁻. Se utilizaron dos cepas diferentes: un completo L3 (cepa B1717, siad (-) Por A (-) completo L3) y un truncado L3 (cepa B1727, siad (-) PorA(-) lgtB(-) TrL3).

El procedimiento de conjugación de EDAC/NHS se utilizó según procedimientos conocidos para reticular LOS y OMP en las vesículas para obtener el componente de oligosacárido de LOS un antígeno T dependiente (EDAC/NHS se prefiere a formaldehído que se encontró que reticula en una extensión demasiado alta que afectaba de este modo adversamente la filtrabilidad). EDAC reacciona con ácidos carboxílicos para crear un intermedio de éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina, se forma un enlace de amida con liberación de un subproducto de isourea. Sin embargo, la eficacia de una reacción mediada por EDAC se puede incrementar mediante la formación de un intermedio de éster Sulfo-NHS. El éster sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más tiempo que el éster formado de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De este modo se pueden llevar a cabo rendimientos más altos de la formación de enlace de amida usando este procedimiento en dos etapas. La conjugación de EDAC/NHS se describe en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220 - 222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173 - 176.

La mezcla de reacción contenía 1,5 mg de Sulfo-NHS y 5 mg de EDAC en sacarosa al 3% (para estabilidad de vesícula) en un volumen final de 1 ml. Las vesículas estaban presentes en una relación de 0,025 mg EDAC/mg de vesículas. Las vesículas estaban presentes en una concentración de 2 mg/ml y el pH se ajustó hasta 7,5 con HCl 0,1 N ó NaOH 0,1N.

La reacción se dejó durante 4 horas a temperatura ambiente y se dializó la mezcla contra tampón fosfato 2 mM que contenía sacarosa al 3%, pH 7,5. Después la mezcla se filtró sobre Sterivex G10 0,22 µm. Se recuperó una producción de 99% de vesículas.

La reacción podría seguirse en una transferencia de Western usando anti.L3 mAb.

representar la mayoría de LOS conjugados que llega a estar covalentemente unido a PorB.

Se encontró que EDAC es un agente excelente de reticulación intra-vesículas en que reticulaba LOS a OMP irreversiblemente y suficientemente para inmunogenicidad T dependiente de LOS mejorado, pero no se reticulaba a tan alto grado que sucedían problemas tales como escasa filtrabilidad, agregación y reticulación intra-vesículas. La morfología de las vesículas generadas es similar a la de las vesículas no conjugadas (como se observó mediante micrografía electrónica). Además el protocolo anterior evitaba que tuviese lugar una reticulación demasiado alta (que puede disminuir la inmunogenicidad de OMP protectoras presentes naturalmente en la superficie de la vesícula por ejemplo TbpA).

Ejemplo 5: L3 y L3 truncado (intermedio lgtB⁻) pueden inducir la producción de ABs bactericida que reconoce LOS L3 truncado (intermedio lgtB⁻; TrL3)

OMV (vesículas) se produjeron de la cepa de MenB H44/76 siaD⁻ PorA⁻ L3 o de H44/76 siad⁻ porA TrL3. Se realizaron dos extracciones diferentes; el porcentaje de DOC usado era bien 0,1% ó 0,5%. También se evaluaron dos formulaciones diferentes de adyuvante: Al(OH)₃ o fosfato de aluminio + 3D-MPL. Ratones (hembras de ratones OF1, 6 - 8 semanas de edad, 30 por grupo) se inyectaron 3 veces (en los días 0, 21 y 28) por vía IM (5 µg de vesículas / inyección). SBA se recogió en la posición II (día 28) y la posición III (día 42) los sueros (sueros combinados o sueros individuales).

El título de media geométrica y el título de sueros combinados para 50% de muerte celular era mayor para los sueros inducidos mediante vesículas extraídas con 0,1% de DOC comparado con la extracción de 0,5% de DOC. Esto se explica probablemente por el hecho que allí tiende a ser 2,5 veces como mucho de LOS en las vesículas anteriores comparada con la última. No había diferencia significativa entre SBA de suero inducido con las vesículas que contienen LOS L3 completo o LOS L3 truncado. Hay un incremento en SBA si las vesículas se adyuvan con fosfato de aluminio + 3D-MPL comparado con hidróxido de aluminio.

También se hicieron experimentos de agotamiento de sueros. Los sueros se agotaron usando 1 mg/ml de L3 o LOS trL3 purificados y después se realizaron SBA sobre estos sueros agotados. Los resultados mostraban que Abs bactericida (que contenía anticuerpos anti-L3) se puede acotar casi completamente mediante pretratamiento de LOS trL3 de sueros, y Abs

capaces de reaccionar con LOS trL3 y Abs bactericida anti-trL3 son de este modo capaces de reaccionar con LOS L3. Además, de este modo se han demostrado la especificidad de Abs bactericida para una estructura de LOS presente en ambos L3 y LOS trL3.

En conclusión, los autores han demostrado que la estructura de TrL3 (en las OMV) es capaz de inducir la producción de Abs bactericida contra cepas L3. En combinación con los experimentos de agotamiento, los autores han mostrado que TrL3 y LOS L3 son estructuras muy próximas en una base inmunológica, y trL3 se puede utilizar para generar Ab capaz de matar cepas L3.

Ejemplo 6: TrL3 soluciona el problema potencial de autoinmunidad con la estructura de L3 completa.

¿Si las estructuras L3 y trL3 están tan próximamente relacionadas inmunológicamente en términos de anticuerpos protectores, hay alguna diferencia entre las estructuras con respecto a las posibles cuestiones de autoinmunidad asociadas con LOS L3 (y L2) [mediante el resto de lacto-N-neotetraosa]? ¿Los autores han dirigido esta cuestión mirando si las aglutininas frías son capaces de reconocer LOS trL3?

MAb 1B2-1B7 (J Bio Chem 256(1981) 10967 - 10972; y depósito de ATCC número TIB - 189) se conoce que aglutinan los glóbulos rojos de adultos de seres humanos (abreviadamente RBC) a bajas temperaturas y reaccionan con LNnT (lacto-N-neotetraosa). Esto es una aglutinina fría típica.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal en el siguiente experimento en conjunción con un anticuerpo monoclonal MabL3,7,9 que es capaz de matar cepas meningocócicas L3.

Estos dos mAbs se utilizaron en ELISA con microplacas prereducidas con poli-L-lisina (1 µg/ml, 2 h a 37°C) y después de recubrieron con L3 purificado o LOS TrL3 purificado (5 µg, durante una noche a 4°C). Después las placas se saturaron con BSA (1%, 30 minutos a temperatura ambiente). Después se llevó a cabo un ELISA convencional con cada uno de los dos anticuerpos.

Los resultados (figura 4) muestran claramente que Mab L379 reacciona con L3 y TrL3

estructuras que contienen tetrasacárido LNnT (tal como LOS L3 y glóbulos rojos de seres humanos).

De este modo LOS TrL3 tiene las características óptimas de ser mucho tiempo suficiente capaz para retener epítomos protectores, pero brevemente suficientes para perder epítomos que pudieran tener implicaciones autoinmunes en seres humanos.

No existe razón para sugerir que esto no debe también ser el caso para la estructura de LOS L2 (IgtB-) truncada propuesta en esta solicitud de patente.

Ejemplo 7: Impacto de reticulación en la pirogenicidad/antigenicidad de vesículas B1820 0,1% de DOC

Vesículas (de la cepa B1820; que se derivaban de H44/76 con siaD(-) PorA(-) FrpB(-)Hsf truncado regulado hacia niveles mayores, L3 truncado mediante la cepa de mutación IgtB(-), cultivadas en presencia de desferral, se extrajeron las vesículas con 0,1% de DOC se reticularon utilizando diferentes concentraciones de EDAC (cuanto más de EDAC está presente, más se reticulan la vesículas). La reticulación es intra-vesícula como se muestra mediante filtración estéril de las vesículas.

El contenido en LOS en las vesículas es 18% como se mide mediante tinción con plata después de electroforesis de SDS-PAGE utilizando LOS L3 Nmen purificado como patrón (Tsai, J. Biol. Standarization (1986) 14: 25 - 33). En general el contenido de LOS en las vesículas extraídas con 0,1% de DOC es alrededor de 20% de LOS, con 0,2% de DOC es alrededor de 15% de LOS, con 0,3% de DOC es alrededor de 10% de LOS y con 0,5% de DOC es alrededor de 5% de LOS. En general las vesículas que comprenden 10% de LOS sin conjugar o más son inaceptablemente pirógenas.

Pirogenicidad en conejos

Se ensayaron dos formulaciones (vesículas absorbidas en $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4) y los conejos recibieron 500 ng/kg por vía IV en un ensayo de pirogenicidad como se describe en la Farmacopea Europea.

Los resultados muestran claramente (en la tabla más adelante) un impacto positivo de la

reticulaban las vesículas (más EDAC) eran menos pirógenas. Esto se observó para dos diferentes formulaciones.

Tratamiento	Formulación		
	Al(OH) ₃	AlPO ₄	Ambas formulaciones §
No reticuladas	3,1*	2,8	5,9
EDAC 0,05 £	2,7	2,2	4,9
EDSC 0,2	1,7	1,7	3,4
EDAC 1	1,5	1,4	2,9

£ Concentración de EDAC: mg de EDAC por mg de vesículas

* Suma de incremento de temperatura (°C) individual (3 conejos por grupo)

§ Suma de seis conejos (3 del grupo de Al(OH)₃ y 3 para el grupo de AlPO₄)

Antigenicidad de vesículas reticuladas

La antigenicidad de las vesículas anteriores (no adsorbidas) se valoró para determinar si la reticulación tenía algún impacto en la antigenicidad de las vesículas. Las diferentes preparaciones de vesículas (reticuladas o no) se recubrieron en una microplaca (10 µg/ml, durante una noche a 4°C). Después de lavado y saturación, se añadieron a la placa dilución en serie de MAb L379 o sueros de ratones inmunizados con B1820 DOC al 0,1 ó al 0,5% (30 minutos a temperatura ambiente con agitación). La fijación de anticuerpos en vesículas recubiertas se revelaba usando Ig anti-ratón acoplado a biotina después usando un complejo de estreptavidina-peroxidasa seguido de un revelado usando OPD y H₂O₂. La densidad de cada micropocillo se medía usando un lector de microplacas.

Los resultados muestran que MAb L379 (dirigida contra LOS L3 pero también capaz de reaccionar con LOS TrL3 (el mutante IgtB⁻) y bactericida contra cepas L3) reconoce equivalentemente vesículas B1820 (sin conjugar) no tratadas y las diferentes vesículas reticuladas (sea la que sea la concentración de EDAC utilizada). Véase la figura 5A. La respuesta más alta obtenida con 0,2 y 1 de EDAC podría reflejar un mejor anclaje de LOS en las vesículas o al menos una mejor estabilidad de LOS en vesículas reticuladas a estas

utilizaron dos diferentes tipos de sueros; el primero se obtuvo de ratones inmunizados con vesículas B1820 0,5% de DOC (vesículas con bajo contenido en LOS < 8% induciendo principalmente anticuerpos antiproteína). El segundo suero se obtuvo de ratones inmunizados con vesículas B1820 0,1% de DOC (vesículas con contenido en LOS > 15% induciendo Abs bactericida cruzado dirigido principalmente contra LOS) Como se observa con MAb, L379 los resultados obtenidos con estos dos sueros (figura 5 B y 5C respectivamente) no mostraban ninguna diferencia entre vesículas no tratadas (sin conjugar) y vesículas reticuladas (sea la que sea la concentración de EDAC utilizada).

En conclusión, parece que la antigenicidad de LOS no se afectaba por la reticulación y que la antigenicidad "global" de las vesículas tampoco se modificaba por el tratamiento de EDAC. Los experimentos de inmunogenicidad en ratones están en curso para confirmar que la reticulación (con altas concentraciones de EDAC) no destruye la inmunogenicidad de antígenos protectores clave. Sin embargo, los resultados preliminares (ejemplo 8) muestran donde la reticulación se hizo con 0,05 de EDAC en vesículas extraídas con 0,5% de DOC indicaban un incremento en la inmunogenicidad de estas vesículas después de tratamiento con EDAC.

Ejemplo 8: Inmunogenicidad de vesículas reticuladas (química con 0,05 mg de EDAC)

En este experimento se produjeron vesículas de la cepa B1727. Esta cepa es una cepa modificada genéticamente de H44/76, que es *siaD(-)* *PorA(-)* *trl_3 (lgtB⁻)* *Hsf+TbpA* regulada hacia niveles mayores) Se extrajeron las vesículas utilizando 0,5% de DOC. Se inmunizaron los ratones tres veces (los días 0, 21 y 28) por vía IM. Por inyección, recibían 5 µg de vesículas adsorbidas en Al(OH)₃.

Se realizó un ensayo bactericida de suero contra la cepa H44/76 en sueros individuales tomados 14 días después de la tercera inyección. Los resultados muestran un impacto positivo de tratamiento de EDAC sobre el número de respondedores (número de ratones con título de SBA > 100): 37% de respondedores para vesículas tratadas con EDAC y solamente 17% con vesículas no modificadas.

La ausencia de 3D-MPL en formulación y el relativamente bajo porcentaje de LOS en

Ratones	B1727SiaD(-)PorA(-) TrL3 TbpA - Hsf Reticulación con "EDAC" Procedimiento "UF/GPC/UF"	Vesículas B1727 SiaD (-) PorA (-) TrL3TbpA - Hsf Sin tratamiento Procedimiento "UF/GPC/UF"
GMT	52	27
SBA en combinaciones	249	60
Respondedores	11/30	5/30

También se realizó un ELISA de anti-Hsf para determinar si la reticulación tiene un impacto en la inmunogenicidad de esta proteína. Los resultados (obtenidos en sueros combinados) indican que la reticulación no tiene impacto en la respuesta de Ig anti-Hsf. No se detectó IgM.

	ELISA de anti-Hsf	
	IgM	IgG
B1727SiaD(-) PorA (-) TbpA- HsfTrL3 Reticulación con "EDAC"	50	18140
B1727Siad(-)PorA(-) TbpA-Hsf Trl_3	50	15627
Control negativo	50	50

Ejemplo 9: Datos de LOS TrL3

El siguiente experimento valoraba:

- el impacto de LOS L3 (IgtB(-)Trl_3) en la inducción de Abs capaz de reaccionar con LNnT (lacto-N-neotetraosa);
- la inducción de anticuerpos bactericidas de la construcción anterior.

Se produjeron las vesículas a partir de dos cepas genéticamente modificadas de H44/76. Ambas eran siaDQ PorA-) pero una producía un WT L3 LOS y la segunda un LOS TrL3 (IgtB(-)). Estas vesículas se produjeron según dos procedimientos diferentes con el fin de

vesículas (por inyección) adsorbidas en $\text{Al}(\text{OH})_3$ con o sin 3D-MPL.

ELISA de anti-LNnT

Procedimiento: se recubrieron microplacas con LNnT conjugado a albúmina sérica de tipo humano mediante un espaciador (ADH) ($5 \mu\text{g}$ de conjugados por mi en PBS, $100 \mu\text{g}$ por micropocillo). Después de una incubación durante una noche a 4°C , se lavaron las placas y se saturaron con 1% de PBS-BSA (40 minutos a temperatura ambiente). Después de lavado, se diluyeron en serie en 0,2% de PBS - 0,5% de BSA.

Se añadió Tween 20 (30 minutos a temperatura ambiente). La fijación de IgG a LNnT se reveló mediante anti-ratón-IgG acoplado a peroxidasa (Jackson) seguido de incubación con OPDA y H_2O_2 .

Resultados: El control positivo es 1B2-1B7 MAb. Este MAb reacciona con LNnT y con LOS L3 (pero no LOS TrL3) (véase ejemplo anterior) y aglutina los glóbulos rojos de seres humanos. El control negativo (-) es suero de ratones inmunizados con adyuvante solo.

Los resultados (figura 6) muestran claramente que solamente las vesículas de L3 con alto contenido en LOS (0,1% de DOC) inducen la producción de IgG capaz de reaccionar con LNnT. Las vesículas de Tr L3 con un contenido similar de LOS no inducen la producción de IgG dirigida contra LNnT, como no lo hacen ambas preparaciones de vesículas que contienen menor cantidad de LOS (0,5% de DOC).

SBA en la cepa H44/76.

Se realizaron ensayos de SBA contra la cepa H44/76 en sueros individuales tomados 14 días después de la tercera inyección. Los resultados muestran claramente más adelante que vesículas LOS trL3 (lgtB(-)) inducen niveles similares de anticuerpos bactericidas que LOS L3 (véase GMT pero también el número de ratones con el título de $\text{SBA} > 1/100 (= \text{SC})$).

Formulación		Vesículas L3		Vesículas TrL3	
		0,5% de DOC	0,1% de DOC	0,5% de DOC	0,1% de DOC
Al(OH) ₃ + MPL	GMT	331	4125	1029	3204
	SC	19/30	29/30	27/30	30/30
Al(OH) ₃	GMT	169	2029	138	828
	SC	14/30	29/30	13/30	30/30

Ejemplo 10: Eliminación de FrpB

Los siguientes datos son un sumario de dos experimentos preclínicos.

En estos experimentos dos cepas genéticamente modificadas de H44/76 se utilizaron para producir vesículas usando 0,1% de DOC. Las vesículas obtenidas mediante este procedimiento tienen un contenido en LOS próximo a 20%.

Las dos cepas de H44/76 eran las siguientes:

- B1733: siaD(-) Por A(-) Tr (truncada) Hsf regulada en ascenso lgtB(-)
- B1820: siaD(-) Por A(-) TrHs regulada hacia niveles mayores lgtB(-) FrpB(-)

Las vesículas se produjeron después de que las cepas se desarrollaran en presencia de desferal para regular hacia niveles mayores la producción de proteínas dependientes de hierro tales como LbpA/B, TbpA/B, FrpB (en B1733), etc.

Las diferentes preparaciones de vesículas se adsorbieron en Al(OH)₃ y se inyectaron en ratones por vía IM dos veces, con una separación de tres semanas. Se tomaron muestras de sangre 7 días después de la segunda administración. Los ratones recibían por inyección 5 µg de vesículas.

Resultados de SBA

Se realizaron ensayos bactericidas en tres cepas de L3 (la cepa de tipo salvaje homóloga H44/76 y dos cepas heterólogas de L3: NZ124 y M97250687. Los resultados muestran claramente que las vesículas (B1820) FrpB(-) (eliminación) inducen una mejor

reducía mediante la supresión de FrpB, es todavía satisfactoria.

Estos datos sugieren que FrpB es un mayor conductor en la respuesta inmune provocada por vesículas, pero, como esta proteína de membrana externa es altamente variable, los anticuerpos dirigidos contra esta proteína son solamente capaces de inducir la muerte de la cepa homologa. La supresión de FrpB en la cepa de producción de vesículas es por lo tanto un medio ventajoso de mejorar la cobertura de la vacuna de vesículas producida.

Vesícula	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

Ejemplo 11: Impacto de la mutación de msbB (lpxLI) sobre la pirogenicidad de vesículas

Dos cepas de NmenB se utilizaron para esta evaluación: la cepa de control que es galE(-) [y de este modo incapaz de fabricar polisacárido capsular] - la cepa mutante *msbB*: que es galE(-) y msbB(-)

Las vesículas se produjeron a partir de estas dos cepas usando 0,1% de DOC con el fin de tener más de 15% de contenido en LOS en las OMV (vesículas). Como se ha establecido en los ejemplos previos, las preparaciones de vesículas con un contenido en LOS mayor que 10% no son satisfactorias desde un punto de vista de pirogenicidad y fracasa el ensayo de pirogenicidad en conejos de la Farmacopea Europea.

Las vesículas anteriores se formularon en Al(OH)₃ (50 µg de OMV/500 µg de sales de Al₃) para un ensayo de pirogenicidad en ratones (500 ng de vesículas/kg inyectados por vía IV).

Los resultados más adelante demuestran claramente que la supresión de *msbB* (particularmente en una cepa incapaz de fabricar polisacárido capsular) permite la producción de vesículas que son no pirógenas en conejos incluso para un contenido

Vesículas	Dilución	Incremento de t° individual (°C)	Suma de t°	Conclusión
Control 0,1% de DOC	0,5 µg/kg	0,7-1,4-1,2	3,3	Fracaso
msbB(-)0,1% de DOC	0,5 µg/kg	0,1 -0,2-0,2	0,5	Pasa

Reglas de la Farmacopea Europea:

- "Pasa" si la suma de t° individuales < 1,15°C
- "Fracasa si no repite" si la suma de t° individuales está entre 1,15°C y 2,65°C
- "Fracasa" si la suma de t° individuales > 2,65 °C

Conclusión:

Una composición que comprende vesículas L3 y L2 derivadas de cepas meningocócicas que tienen las mutaciones lgtB(-) y msbB(-) y se extraen con bajas concentraciones de desoxicolato (por ejemplo 0,1%) proporciona una base fuerte para una vacuna eficaz, segura contra meningococo B. Las cepas de producción de vesículas son idealmente deficientes en síntesis de polisacárido capsular y tienen LOS que están reticulados intra-vesícula a la proteína de membrana externa. Cualquier o ambas de PorA(-) y FrpB(-) son de ayuda adicional en la mejora de la eficacia bactericida cruzada, como son regulaciones hacia niveles mayores de antígenos Hsf y/o TbpA.