

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 231**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08838605 .7**
- 96 Fecha de presentación: **17.10.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2200642**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Formulaciones para vacunas meningocócicas**

30 Prioridad:
19.10.2007 US 999590 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.06.2012

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**CONTORNI, Mario;
KAZZAZ, Jina;
O'HAGAN, Derek;
SINGH, Manmohan y
UGOZZOLI, Mildred**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 383 231 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones para vacunas meningocócicas

Campo de la técnica

La presente invención está en el campo de la formulación de vacunas meningocócicas.

5 Técnica anterior

En la actualidad se están investigando varias vacunas contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* ("Men-B"), pero comparten una característica común.

10 Los productos de vesícula de la membrana externa (VME) producidos por Novartis (MENZB™), por el Finlay Institute (VAMENGOC-BC™), por el Norwegian Institute of Public Health (MENBVACT™) y por el Netherlands Vaccine Institute (HEXAMEN™ y NONAMEN™) incluyen todos ellos un adyuvante de hidróxido de aluminio. La "vacuna universal para meningococo de serogrupo B" comunicada por Novartis en la referencia 1 también incluye un adyuvante de hidróxido de aluminio, como también lo incluye la vacuna bivalente de VME notificada recientemente en la referencia 2.

Divulgación de la invención

15 Al desarrollar la vacuna Men-B de Novartis, los inventores han descubierto que la inmunogenicidad óptima requiere la presencia de un adyuvante. Además, han descubierto que la adsorción en hidróxido de aluminio proporciona buena estabilidad de almacenamiento para los antígenos de la vacuna. No obstante, para evitar la necesidad de usar sales de aluminio se han buscado alternativas.

20 El uso de adyuvantes que no sean de aluminio para vacunas Men-B ya se conoce. Por ejemplo, la referencia 3 notifica el uso de la emulsión de aceite en agua MF59 como adyuvante para vesículas Men-B y la referencia 4 describe el uso de oligonucleótidos inmunoestimulantes y/o MF59 como adyuvantes. Aunque los resultados de inmunogenicidad con MF59 fueron excelentes y la investigación continua ha mostrado que este adyuvante puede potenciar la cobertura de cepas de una vacuna Men-B en comparación con el hidróxido de aluminio, otros trabajos han mostrado inesperadamente que los inmunógenos de Men-B adyuvados con emulsiones de aceite en agua tienen una estabilidad mala a largo plazo. Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar modos de mejorar la estabilidad durante el almacenamiento de las vacunas Men-B cuando se usan emulsiones de aceite en agua como adyuvantes.

25 La experiencia previa con emulsiones de aceite en agua procede del área de las vacunas contra la gripe. El producto FLUAD™ incluye la emulsión MF59 y se distribuye en un formato líquido premezclado en un único contenedor (el enfoque "un vial"). Esta formulación premezclada es la formulación que ahora se ha descubierto que ofrece una mala estabilidad para las vacunas Men-B.

30 Como alternativa a la formulación de "un vial" con vacunas de emulsiones de aceite en agua, se ha estado usando un enfoque de "dos viales" para la gripe (p. ej., véase la ref. 5), para el VHS (p. ej., véase la ref. 6) y para el VIH (p. ej., véase la ref. 7), en el que la vacuna y la emulsión están distribuidas juntas, en formato líquido ambas, para mezclar de forma extemporánea en el momento del uso.

35 E acuerdo con la presente invención, se sigue un enfoque diferente para las vacunas Men-B, usando una formulación doble de (i) un adyuvante de emulsión de aceite en agua y (ii) un componente inmunogénico Men-B en forma liofilizada. Los antígenos Men-B liofilizados se pueden reconstituir en forma de líquido adyuvado en el momento de usar listo para administrar a un paciente. Se ha descubierto que esta formulación proporciona excelentes resultados en términos de estabilidad y de inmunogenicidad.

40 Los inventores también han descubierto que el componente liofilizado puede retener su eficacia cuando se incluye uno o más sacáridos conjugados de *N. meningitidis* en los serogrupos A, C, W135 y/o Y (Men-A, -C, -W135 e -Y). La combinación de antígenos para inmunizar contra múltiples serogrupos de meningococo, incluido el serogrupo B, usando un único componente liofilizado, es particularmente ventajosa.

45 Por tanto, la invención proporciona un kit que comprende: (i) un primer contenedor que contiene un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua; y (ii) un segundo contenedor que contiene una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno para producir una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N. meningitidis*. La composición antigénica liofilizada puede además comprender un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*.

50 La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar:

(i) un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua; y (ii) una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno para producir una respuesta inmunitaria contra el serogrupo B de *N. meningitidis*. La

composición antigénica liofilizada puede además comprender un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*.

La composición antigénica liofilizada

5 La invención usa una composición antigénica liofilizada que incluye un inmunógeno para producir una respuesta inmunitaria contra Men-B. Opcionalmente puede incluir un sacárido capsular conjugado de uno o más de Men-A, Men-C, Men-W135 y/o Men-Y.

El inmunógeno Men-B puede comprender vesículas de membrana de una bacteria Men-B y/o proteínas recombinantes de Men-B y/o lipooligosacárido (LOS) de Men-B.

10 La liofilización de las VME de Men-B se conoce en la técnica [8], pero estas VME se administraron después junto con un adyuvante de fosfato de aluminio. Por tanto, el problema de la estabilidad del antígeno cuando se combina con una emulsión de aceite en agua adyuvante no se comunicó. Se conoce una liofilización similar de los antígenos conjugados de meningococo, incluyendo la reconstitución posterior con MF59 [9], pero no en combinación con ningún antígeno Men-B-

Componentes de Men-B que comprenden las vesículas

15 Las vesículas para usar como componentes de vacuna de Men-B incluyen cualquier vesícula proteoliposómica obtenida rompiendo una membrana externa bacteriana para formar vesículas de la misma que incluyen componentes proteicos de la membrana externa. Por tanto, el término incluye VME (en ocasiones denominadas "ampollas"), microvesículas (MV [10]) y VME nativas ("NVME" [11]).

20 Las VM y las NVME son vesículas de membrana que se producen de forma natural y se forman de forma espontánea durante el crecimiento bacteriano y se liberan al medio de cultivo. Las VM se pueden obtener cultivando *Neisseria* en medio de caldo cultivo, separando las células enteras de las VM más pequeñas en el medio de caldo cultivo (p. ej., mediante filtración o mediante centrifugación de baja velocidad, para sedimentar únicamente las células y no las vesículas, que son más pequeñas), y, después, recoger las VM del medio sin células (p. ej., mediante filtración, mediante precipitación diferencial o agregación de VM, mediante centrifugación a velocidad alta para sedimentar las VM. Las cepas para usar en la producción de VM pueden seleccionarse, en general, en base a la cantidad de VM producidas en el cultivo, por ejemplo las ref. 12 y 13 describen *Neisseria con producción de VM* alta.

30 Las VME se preparan artificialmente a partir de bacterias y se pueden preparar usando tratamiento con detergente (p. ej., con desoxicolato) o por medios sin detergente (p. ej., véase la referencia 14). Procedimientos para obtener preparaciones de VME adecuadas se divulgan en, por ejemplo, las referencias citadas en el presente documento. Técnicas para formar VME incluyen el tratamiento de las bacterias con un detergente de sal de ácido biliar (p. ej., sales de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico etc., siendo preferido el desoxicolato sódico [15 & 16] para tratar *Neisseria*) a un pH suficientemente alto como para no precipitar el detergente [17]. Se pueden efectuar otras técnicas sustancialmente en ausencia de detergente [14] usando técnicas tales como sonicación, homogeneización, microfluidificación, cavitación, shock osmótico, molarización, prensa francesa, mezclado etc. Los procedimientos que no usan detergente, o usan muy poco, pueden retener antígenos útiles, tales como NspA [14]. Por tanto, un procedimiento puede usar un tampón de extracción de VME con desoxicolato al aproximadamente 0,5 % o menor, por ejemplo aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 %, < 0,05 % o cero.

40 Un procedimiento útil para la preparación de VME se describe en la referencia 18 e implica ultrafiltración en VME en bruto, en lugar de centrifugación de velocidad alta. El procedimiento puede implicar una etapa de ultracentrifugación una vez que tiene lugar la ultrafiltración.

45 Las vesículas se pueden preparar a partir de cualquier cepa de Men-B para usar con la invención. Pueden ser de cualquier serotipo (p. ej., 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), cualquier serosubtipo y cualquier inmunotipo (p. ej., L1; L2; L3; L3,3,7; L10; etc.). Los meningococos pueden ser de cualquier linaje adecuado, incluidos linajes hipervirulentos e hipervirulentos, por ejemplo cualquiera de los siete linajes hipervirulentos siguientes: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complejo ET-5; complejo ET-37; clúster A4; linaje 3. Estos linajes se han definido mediante electroforesis enzimática multilocus (MLEE), pero también se ha usado tipado multilocus de secuencia (MLST) para clasificar los meningococos [ref. 19], por ejemplo el complejo ET-37 es el complejo ST-11 mediante MLST, el complejo ET5 es ST-32 (ET-5), el linaje 3 es ST-41/44, etc. Las vesículas se pueden preparar a partir de cepas que tienen uno de los subtipos siguientes: P1.2; P1.2,5; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.5,c; P1.5c,10; P1.7,16; P1.7,16b; P1.7h,4; P1.9; P1.15; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.21,16; P1.22,14.

55 Las vesículas usadas con la invención se pueden preparar a partir de cepas de Men-B silvestres o de cepas mutantes. Por ejemplo, la referencia 20 divulga preparaciones de vesículas obtenidas de *N. meningitidis* con un gen *fur* modificado. La referencia 27 enseña que la expresión de *nspA* se regulará por aumento con inactivación de *porA* y *cps* concomitante. Otros mutantes defectivos de *N. meningitidis* para la producción de VME se divulgan e las referencias 27 a 29. La referencia 21 divulga vesículas en las que fHBP está regulado por aumento. La referencia 22

divulga la construcción de vesículas de las cepas modificadas para expresar seis subtipos PorA diferentes. *Neisseria* mutante con niveles bajos de endotoxina, alcanzados mediante deficiencia de enzimas implicadas en la biosíntesis de LPS, también se puede usar [33,24]. Estos y otros mutantes se pueden usar todos ellos de acuerdo con la invención.

5 Por tanto, una cepa de Men-B usada con la invención puede, en ocasiones, expresar más de un subtipo de PorA. Previamente se han construido cepas PorA hexavalentes y nonavalentes. La cepa puede expresar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de subtipos de PorA: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1 y/o P1.18-1,3,6. En otras realizaciones, una cepa puede haber sido regulada por disminución para la expresión de PorA, por ejemplo en la que la cantidad de PorA se ha reducido en al menos un 30% (p.ej. $\geq 30\%$, $>40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, etc.), o incluso son defectivos, respecto a los niveles silvestres (p.ej., respecto a la cepa H44/76, como se ha divulgado en la referencia 30).

En algunas realizaciones, una cepa Men-B puede sobreexpresar (respecto a la correspondiente cepa silvestre) ciertas proteínas. Por ejemplo, las cepas pueden sobreexpresar NspA, proteína 287 [45], fHBP [21], TbpA y/o TbpB [25], Cu, Zn superóxido dismutasa [25], etc.

15 En algunas realizaciones, una cepa Men-B puede incluir uno o más de las mutaciones defectivas y/o sobreexpresión divulgadas en las referencias de 26 a 29. Genes preferidos para la regulación por disminución y/o inactivación incluyen: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, and/or TbpB [26]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, and/or TbpB [27]; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB [28]; and (d) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, OpA, OpC, PilC, PorB, SiaD, SynA, SynB, y/o SynC [29].

20 Cuando se usa una cepa mutante, en algunas realizaciones puede tener una o más, o todas, de las características siguientes: (i) LgtB y/o GalE regulado por disminución o inactivación para truncar el LOS meningocócico; (ii) TbpA regulado por aumento; (iii) Hsf regulado por aumento; (iv) Omp85 regulado por aumento; (v) lopa regulado por aumento; (vi) NspA regulado por aumento; (vii) PorA defectivo; (viii) FrpB regulado por disminución o defectivo; (ix) Opa regulado por disminución o defectivo; (x) Opc regulado por disminución o defectivo; (xii) complejo génico con delección de cps. Un LOS truncado puede ser uno que no incluya un epítipo de sialil-lacto-N-neotetraosa, por ejemplo podría ser LOS deficiente en galactosa. El LOS puede no tener cadena α .

30 Si LOS está presente en una vesícula, es posible tratar la vesícula para vincular LOS y sus componentes proteicos (conjugación "intra-ampolla" [29]).

La invención puede usar con mezclas de vesículas de diferentes cepas. Por ejemplo, la referencia 30 divulga una vacuna que comprende composiciones de vesícula meningocócica multivalente, que comprende una primera vesícula de una cepa meningocócica con un serosubtipo prevalente en un país de uso y una segunda vesícula derivó de una cepa que no tiene que tener un serosubtipo prevenido en un país de uso. La referencia 31 también divulga combinaciones útiles de diferentes vesículas. Una combinación de vesículas de cepas de cada uno de los inmunotipos L2 y L3 se puede usar en algunas realizaciones.

Los antígenos basados en vesículas se pueden preparar a partir de serogrupos distintos a MEN-B (p. ej., la referencia 17 divulga un procedimiento para Men-A). La invención puede usarse, en consecuencia, con vesículas preparadas de serogrupos distintos a Men-B (p. ej., A, C, W135 y/o Y). No obstante, el objetivo principal es Men-B.

40 Componentes de Men-B que comprenden proteínas recombinantes

También se ha comunicado el uso de proteínas recombinantes como inmunógenos para vacunas contra Men-B. Por ejemplo, varios antígenos se comunican en las referencias 32 a 40. Estos antígenos se pueden usar solos o en combinaciones. Cuando múltiples proteínas purificadas se combinan, es útil usar una mezcla de 10 o menos (p. ej., 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados.

45 Una combinación particularmente útil de antígenos se divulga en las referencias 1 y 40 y, por tanto, una composición puede incluir 1, 2, 3, 4 o 5 de: (1) una proteína (NadA[™]); (2) una proteína 'fHBP', anteriormente conocida como "741"; (3) una proteína "936"; (4) una proteína "953"; y (5) una proteína "287". Otras posibles combinaciones de antígenos pueden comprender una proteína de unión a la transferrina (p. ej., TbpA and/or TbpB) y un antígeno Hsf. Otros posibles antígenos purificados incluyen proteínas que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

50 SC ID N° 650 de la ref. 32; SC ID N° 879 de la ref. 32; SC ID N° 884 de la ref. 32; SC ID N° 4 de la ref. 33; SC ID N° 598 de la ref. 34; SC ID N° 818 de la ref. 34; SC ID N° 864 de la ref. 34; SC ID N° 866 de la ref. 34; SC ID N° 1196 de la ref. 34; SC ID N° 1272 de la ref. 34; SC ID N° 1274 de la ref. 34; SC ID N° 1640 de la ref. 34; SC ID N° 1788 de la ref. 34; SC ID N° 2288 de la ref. 34; SC ID N° 2466 de la ref. 34; SC ID N° 2554 de la ref. 34; SC ID N° 2576 de la ref. 34; SC ID N° 2606 de la ref. 34; SC ID N° 2608 de la ref. 34; SC ID N° 2616 de la ref. 34; SC ID N° 2668 de la ref. 34; SC ID N° 2780 de la ref. 34; SC ID N° 2932 de la ref. 34; SC ID N° 2958 de la ref. 34; SC ID N° 2970 de la ref. 34; SC ID N° 2988 de la ref. 34, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene una identidad del 50% o más (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, en las que n es 7 o más

(p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítipo de la secuencia relevante. Se pueden incluir más de uno (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos.

- 5 El antígeno fHBP entra dentro de tres variantes distintas [39]. Un componente Men-B de la invención puede incluir una única variante de fHBP, pero útilmente incluirá un fHBP de cada una de dos o de las tres variantes. Por tanto, puede incluir una combinación de dos o tres fHBP purificados diferentes, seleccionados de: (b) una primera proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 50 % con la SEC ID N° 1 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 1; (b) una segunda proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el b % con la SEC ID N° 2 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 2; y/o (c) una tercera proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el c % con la SEC ID N° 3 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 3.
- 10
- 15 El valor de a es al menos 85, *por ejemplo* 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de b es al menos 85, *por ejemplo* 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de c es al menos 85, *por ejemplo* 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. Los valores de a, b y c no están intrínsecamente relacionados entre sí.

- 20 El valor de x es al menos 7, *por ejemplo* 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de y es al menos 7, *por ejemplo* 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de z es al menos 7, *por ejemplo* 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Los valores de x, y y z no están intrínsecamente relacionados entre sí.

- 25 En algunas realizaciones, la(s) proteína(s) fHBP se lipidarán en, por ejemplo, una cisteína de extremo N. En otras realizaciones, no estarán lipidadas.

- Una composición útil basada en proteínas purificadas comprende una mezcla de: (i) un primer polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 4; (ii) un primer polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 5 o la SEC ID N° 7; y (iii) un primer polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 6. Véanse las ref. 1 y 40.
- 30

Componentes de Men-B que comprenden LOS

- Se han notificado vacunas meningocócicas basadas en lipooligosacárido. El LOS se puede usar solo o conjugado con un vehículo. Cuando está conjugado, la conjugación puede ser a través de una porción del lípido A en el LOS o a través de cualquier otro resto adecuado, por ejemplo sus residuos de KDO. Si el resto lípido A de LOS está ausente, es esencial una unión alternativa de este tipo.
- 35

El LOS puede ser de cualquier inmunotipo, por ejemplo, L2, L3, L7, etc.

- En lugar de de usar el LOS nativo, se prefiere usar una forma modificada. Esas modificaciones se pueden realizar químicamente, pero es más cómodo inactivar las enzimas en Men-B responsables de ciertas adiciones biosintéticas. Por ejemplo, el LOS se puede modificar para eliminar al menos el Gal terminal de la unidad de lacto-N-neotetraosa nativa y esta modificación se puede realizar inactivando una o más de las enzimas relevantes. Las enzimas responsables de la adición de dos monosacáridos terminales en un LOS nativo (ácido siálico y galactosa) se pueden inactivar, bien para eliminar solo el Sia terminal o para eliminar el disacárido Sia-Gal. Por ejemplo, la inactivación del gen *lgtB*, elimina el disacárido Sia-Gal. Una inactivación del gen *galE* también proporciona un LOS modificado útil. Se puede inactivar un gen de lípido A graso transferasa [41].
- 40

- 45 Al menos un ácido graso unido a O primario se puede eliminar del LOS [42]. También se puede usar el LOS que tiene un número reducido de cadenas de acilo secundarias por molécula de LOS [43]. El LOS puede no tener cadena α .

El LOS puede comprender GlcNAc-Hep₂fosfoetanolamina-KDO₂-Lípido A [44].

Componentes mixtos de Men-B

- 50 La invención puede usar vesículas, polipéptidos purificados o LOS como antígeno Men-B. También Puede usar combinaciones de estos tres antígenos, por ejemplo (i) vesículas + polipéptidos purificados; (ii) vesículas + LOS; (iii) polipéptidos purificados + LOS; o (iv) vesículas + polipéptidos purificados + LOS; o (iv) vesículas + polipéptidos purificados + LOS. Estas combinaciones se pueden realizar preparando cada componente individual por separado y mezclándolos después. Por ejemplo, la referencia 45 divulga la adición de proteínas purificadas a vesículas para proporcionar una composición con una eficacia más amplia.
- 55

Serogrupos A, C, W135 e Y

Las vacunas monovalentes conjugadas contra el serogrupo C se han aprobado para uso humano e incluyen MENJUGATE™, MENINGITEC™ y NEISVAC-C™. Se conocen mezclas de conjugados de los serogrupos A+C [46,47] y se han notificado mezclas de conjugados de los serogrupos A+C+W135+Y [48-51] y se aprobaron en 2005 como el producto acuoso MENACTRA™.

El componente liofilizado usado con la invención puede incluir uno o más conjugados de sacáridos capsulares de 1, 2, 3, o 4 de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, por ejemplo A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, A+W135+Y, A+C+W135+Y, etc. Se prefieren los componentes que incluyen sacáridos de los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y.

El sacárido capsular del meningococo del serogrupo A es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato unido a ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La acetilación en la posición C-3 puede ser del 70-95 %. Las condiciones usadas para purificar el sacárido pueden dar lugar a la O-acetilación (p. ej., en condiciones básicas), pero es útil conservar el OAc en esta posición C3. En algunas realizaciones, al menos el 50 % (p. ej., al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de los residuos de manosamina en sacáridos del serogrupo A también está O-acetilado en la posición C-3. Los grupos acetilo pueden sustituirse con grupos bloqueantes para prevenir la hidrólisis [52], y estos sacáridos modificados siguen siendo sacáridos del serogrupo A dentro del significado de la invención.

EL sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico unido a ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido N-acetilneuramínico o 'NeuNAc'). La estructura del sacárido se escribe como $\rightarrow 9$ -Neu p NAc 7/8 OAc-($\alpha 2 \rightarrow$). La mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los residuos de ácido siálico, pero aproximadamente el 15 % de los aislamientos clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [53,54]. La presencia o ausencia de grupos OAc genera epítomos únicos y la especificidad de la unión del anticuerpo al sacárido puede afectar a su actividad bactericida contra las cepas O-acetiladas (OAc+) y des-O-acetiladas (OAc-) [55-57]. Los sacáridos del serogrupo C usados con la invención se pueden preparar a partir de cepas OAc+ u OAc-. Las vacunas conjugadas Men-C aprobadas incluyen sacáridos tanto OAc-(NEISVAC-C™) como OAc+ (MENJUGATE™ & MENINGITEC™). En algunas realizaciones, las cepas para la producción de los conjugados del serogrupo C son cepas OAc+, por ejemplo del serotipo 16, serosubtipo P1.7a,1, etc. Por tanto, se pueden usar cepas C:16:P1.7a,1 OAc+. Las cepas OAc+ del serosubtipo P1.1 también son útiles, tal como la cepa C11.

El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades del disacárido ácido siálico-galactosa. Como el sacárido del serogrupo C, tiene O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [58]. La estructura se escribe como: $\rightarrow 4$ -DNeup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Gal- α -($1 \rightarrow$).

El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, a excepción de que la unidad de disacárido de repetición incluye glucosa en lugar de galactosa. Como el serogrupo W135, tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [58]. La estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Glc- α -($1 \rightarrow$).

Los sacáridos usados de acuerdo con la invención pueden estar O-acetilados, como se ha descrito antes (p. ej., con el mismo patrón de O-acetilación que se ve en los sacáridos capsulares nativos) o pueden estar parcial o totalmente O-acetilados en una o más posiciones de los anillos de sacárido, o pueden estar hiper-O-acetilados respecto a los sacáridos capsulares nativos,

Los restos sacáridos en los conjugados pueden comprender sacáridos de longitud completa como los preparados a partir de meningococos o pueden comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa, es decir, los sacáridos pueden ser más cortos que los sacáridos capsulares nativos que se ven en las bacterias. Por tanto, los sacáridos pueden estar despolimerizados, produciéndose la despolimerización durante o después de la purificación del sacárido pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos. Un procedimiento de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno [48]. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (p. ej., para dar una concentración final de H₂O₂ del 1 %) y la mezcla se incuba después (p. ej., a aproximadamente 55 °C) hasta que se ha conseguido una reducción deseada de la longitud de la cadena. Otro procedimiento de despolimerización implica hidrólisis ácida [49]. Otros procedimientos de despolimerización se conocen en la técnica. Los sacáridos usados para preparar los conjugados para usar de acuerdo con la invención se pueden obtener mediante cualquiera de estos procedimientos de despolimerización. La despolimerización se puede usar para proporcionar una longitud de cadena óptima para inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de cadena para que los sacáridos se puedan manipular físicamente. En algunas realizaciones, los sacáridos tienen el siguiente intervalo de grados medios de despolimerización (Dp): A=10-20; C=12-22; W135=15-25; Y=15-25. En términos de peso molecular en lugar del Dp, los intervalos útiles para todos los serogrupos son: <100 kDa; 5 kDa-75 kDa; 7 kDa-50 kDa; 8 kDa-35 kDa; 12 kDa-25 kDa; 15 kDa-22 kDa.

En algunas realizaciones, el peso molecular medio para los sacáridos de cada serogrupo meningocócico A, C, W135 e Y puede ser más de 50 kDa, por ejemplo ≥ 75 kDa, ≥ 100 kDa, ≥ 110 kDa, ≥ 120 kDa, ≥ 130 kDa, etc. [59], e incluso de hasta 1500 kDa, en concreto tal como se determina mediante MALLS. Por ejemplo: un sacárido Men-A puede

estar en el intervalo de 50-500 kDa, por ejemplo 60-80 kDa; un sacárido Men-C puede estar en el intervalo de 100-210 kDa; un sacárido Men-W135 puede estar en el intervalo de 60-190 kDa, por ejemplo 120-140 kDa; y/o un sacárido Men-Y puede estar en el intervalo de 60-190 kDa por ejemplo 150-160 kDa.

5 La masa de sacárido meningocócico por serogrupo en la vacuna reconstituida normalmente estará entre 1 µg y 20 µg, p. ej. entre 2 y 10 µg por serogrupo o aproximadamente 4 µg o aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg. Cuando se incluyen conjugados de más de un serogrupo, pueden estar presentes en masas sustancialmente iguales, por ejemplo la masa de cada sacárido de cada serogrupo está dentro de + 10 % del otro. Como alternativa a una proporción igual, se puede usar una masa doble del sacárido del serogrupo A. Por tanto, una vacuna puede incluir el sacárido Men-A a 10 µg y Men-C, los sacáridos -W135 e -Y a 5 µg cada uno.

10 Las proteínas vehículos preferidas son toxinas bacterianas, tales como las toxinas o toxoides de difteria o tétanos o mutantes de los mismos. Estos se usan normalmente en las vacunas conjugadas. La toxina diftérica CRM₁₉₇ es particularmente preferida [60]. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen el complejo de la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [61], péptidos sintéticos [62,63], proteínas del shock térmico [64,65], proteínas de pertussis [66,67], citocinas [68], linfocinas [68], hormonas [68], factores de crecimiento [68], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de varios antígenos derivados de patógenos [69] tales como N19 [70], la proteína D de *H. influenzae* [71-73], la neumolisina [74] o sus derivados no tóxicos [75], la proteína de la superficie del neumococo PspA [76], las proteínas de captación de hierro [77], la toxina A o B de *C. difficile* [78], la exoproteína a recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) [79], etc. Una única proteína vehículo puede transportar sacáridos de múltiples serogrupos diferentes [80], pero esta disposición no se prefiere.

15 Cuando el componente liofilizado incluye conjugados de más de un serogrupo meningocócico, los diversos conjugados pueden usar diferentes proteínas vehículo (p. ej., un serogrupo en CRM₁₉₇, otro en el toroide del tétanos) o pueden usar la misma proteína vehículo (p. ej., sacáridos de dos serogrupos conjugados por separado a CRM₁₉₇ y, después, combinados).

20 Se pueden usar los conjugados con una proporción sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido), por ejemplo proporciones entre 1:2 y 5:1 y proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Como se describe en la referencia 81, conjugados de diferentes serogrupos en una mezcla pueden tener diferentes proporciones sacárido:proteína, por ejemplo una puede tener una proporción entre 1:2 y 1:5, mientras que otra tiene una proporción entre 5:1 y 1:1.99.

Los sacáridos y los conjugados que tienen las características divulgadas en la referencia 82 son útiles.

30 La molécula vehículo puede estar conjugada covalentemente al sacárido meningocócico directamente o a través de un ligador. Se conocen varios ligadores, por ejemplo un ligador de ácido adípico, que se puede formar mediante acoplamiento de un grupo-NH₂ libre (p. ej., introducirse en un sacárido mediante aminación) con ácido adípico (usando, por ejemplo, activación de diimida) y, después, acoplando una proteína al intermedio sacárido-ácido adípico resultante [83, 84]. Otro tipo preferido de unión es un ligador de carbonilo, que puede formarse mediante

35 reacción de un grupo hidroxilo libre de un sacárido con CDI [85, 86], seguido de la reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otros ligadores incluyen B-propionamido [87], nitrofenil-etilamina [88], haluros de haloacilo [89], enlaces glicosídicos [90], ácido 6-aminocaproico [91], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [92], ácido adípico dihidrazida ADH [93], restos de C₄ a C₁₂ [94] etc. También se puede usar condensación con carbodiimida [95].

40 Como se describe en la referencia 96, una mezcla puede incluir un conjugado con enlace sacárido/proteína directo y otro conjugado con enlace a través de un ligador. Esta disposición se aplica en concreto cuando se usan conjugados sacáridos de diferentes serogrupos meningocócicos, por ejemplo los sacáridos Men-A y Men-C se pueden conjugar a través de un ligador, mientras que los sacáridos Men-W135 y Men-Y se pueden conjugar directamente a una proteína vehículo.

45 Cuando una composición incluye uno o más de los conjugados Men-A, -C, -W y/o -Y, en algunas realizaciones puede incluir, ventajosamente, un conjugado Hib también (véase más adelante). Cuando una composición incluye sacáridos de más de un serogrupo meningocócico, existe una masa media de sacárido por serogrupo. Si se usan masas sustancialmente iguales de cada serogrupo, la masa media será la misma masa que cada una individual; cuando se usan masas no iguales, la media será diferente, por ejemplo con una cantidad de 10:5:5 µg para una

50 mezcla Men-ACWY, la masa media es de 6,25 µg por serogrupo. Si también se incluye un sacárido Hib, en algunas realizaciones su masa será sustancialmente la misma que la masa media del sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa del sacárido Hib será mayor que (p. ej., al menos 1,5 x) la masa media del sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa del sacárido Hib será menor que (p. ej., al menos 1,5 x) la masa media del sacárido meningocócico por serogrupo [97].

55 **Adyuvante de emulsión de aceite en agua**

Se conocen varios adyuvantes de emulsión de aceite en agua y normalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el(los) aceite(s) y el(los) tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Generalmente, las gotas de aceite en la emulsión tienen un diámetro inferior a 5 µm, e incluso

pueden tener un diámetro de submicrones, alcanzándose estos pequeños tamaños con un microfluidificador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización en filtro.

La invención se puede usar con aceites como los procedentes de un animal (como un pez) o una fuente vegetal. Entre las fuentes de aceites vegetales se incluyen nueces, semillas y granos. Como ejemplos de aceites de nuez están el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco y el aceite de oliva, los disponibles con mayor frecuencia. Se puede usar aceite de jojoba, obtenido, por ejemplo, de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el disponible más fácilmente, pero también pueden usarse aceites de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, mijo, triticale y similares. Los ésteres de ácido graso de 6-10 átomos de carbono del glicerol y de 1,2-propanodiol, aunque no se producen de forma natural en los aceites de semilla, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados a partir de los aceites de frutos secos y de semillas. Las grasas y los aceites de la leche de mamífero son metabolizables y, por tanto, pueden usarse en la práctica de esta invención. Los procedimientos de separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar con facilidad. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón y el aceite de ballena, como esperma de ballena, son ejemplos de los diversos aceites de pescado que se pueden usar en la presente memoria descriptiva. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y normalmente se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado conocidos como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, También es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, están disponibles fácilmente en fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles. También se pueden usar mezclas de aceites. Cuando una composición incluye un tocoferol, se pueden usar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ -tocóferoles, pero se prefieren los α -tocóferoles. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo diferentes sales y/o isómeros. Entre las sales se incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato etc. También se pueden usar el D- α -tocóferol y el DL- α -tocóferol. Un α -tocóferol preferido es DL- α -tocóferol y la sal preferida de este tocoferol es el succinato.

Los tensioactivos se pueden clasificar por su "EHL" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un EHL de al menos 10, preferentemente de al menos 15 y más preferentemente de al menos 16. La invención se puede usar con tensioactivos que incluyen, entre otros: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitano (normalmente denominados los Tween), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP), y/u óxido de butileno (OB), vendidos con el nombre comercial de DOWFAX™, tal como copolímeros de bloque de OE/OP, octoxinolos, en los que puede variar el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiol) que se repiten, de los que el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) es de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitano (normalmente conocidos como los SPAN), tal como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Entre los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión están Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100.

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo mezclas de Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitano tal como monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80) y un octoxinol, tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende lauret -9 más un éster de polioxietilensorbitano y/o un octoxinol.

Cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: Ésteres de polioxietilensorbitano (tal como Tween 80) 0,01 a 1%, en particular aproximadamente 0,1 %; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100 u otros detergentes de la serie Triton) 0,001 a 0,1 %, en particular 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (tales como lauret 9) 0,1 a 20%, preferentemente de 0,1 a 10% y, en particular, 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5%.

Los adyuvantes en emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, entre otros:

- una emulsión en submicrones de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de Span 85. En términos de peso, estas cantidades se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [98-100], como se describe con mayor detalle en el Capítulo 10 de la ref. 101 y el capítulo 12 de la ref. 102. La emulsión de MF59 puede incluir iones citrato, por ejemplo tampón citrato sódico 10mM.
- Una emulsión de escualeno, tocoferol y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (*p. ej.*, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de Tween 80, y la proporción en peso de

- escualeno:tocoferol es, preferentemente, ≤ 1 , dado que esta proporciona una emulsión más estable. Escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en una proporción en volumen de aproximadamente 5:2. Una de estas emulsiones puede prepararse mediante la disolución de Tween 80 en PBS para dar una solución al 2%, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno) y, posteriormente, microfluidificando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite en submicrones, por ejemplo con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm.
- 5 • Una emulsión de escualeno, α -tocoferol y un detergente Triton (p. ej., Triton X-100). La emulsión debe también incluir un 3d-MPL. La emulsión puede contener un tampón fosfato.
 - 10 • Una emulsión que comprende un polisorbato (p. ej., polisorbato 80), un detergente Triton (p. ej., Triton X-100) y un tocoferol (p. ej., un α -tocoferol succinato). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una proporción de masa de aproximadamente 75:11:10 (p. ej., 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de α -tocoferol succinato) y estas concentraciones deberán incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión debe también incluir escualeno.
 - 15 La emulsión debe también incluir un 3d-MPL. La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
 - Una emulsión de escualeno, poloxámero 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de liberación útil para dipéptidos de muramilo y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [103] (0,05-1% Thr-MDP, 5% de escualano, 2,5 % de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También se puede usar con Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [104] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidificación.
 - 20 • Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter de polioxietilentalquilo (p. ej., éter cetoestearílico de polioxietileno (12) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (p. ej., un éster de sorbitano o éster de manida, tal como monooleato de sorbitano o "Span 80"). Preferentemente, la emulsión es termorreversible y/o tiene al menos un 90% de las gotas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [105]. La emulsión puede también incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (p. ej., un azúcar tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.
 - 25 • Una emulsión que tiene de 0,5-50 % de un aceite, 0,1-10 % de un fosfolípido y 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Como se ha descrito en la referencia 106, componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gotas de submicrones son ventajosos.
 - 30 • Una emulsión submicrónica de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como un aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tal como QuilA saponina, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 107, producido mediante la adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetilydoctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietyl)propanodiamina.
 - 35 • Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico y un tensioactivo hidrófilo no iónico (p. ej., un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [108].
 - 40 • Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipófilo no iónico (p. ej., un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [108].
 - 45 • Una emulsión en la que una saponina (p. ej., QuilA o QS21) y un esteroide (p. ej., colesterol) se asocian en forma de micelas helicoidales [109].

Se pueden usar emulsiones de aceite en agua como adyuvantes, solas o como vehículos para compuestos inmunoestimulantes, por ejemplo oligonucleótidos inmunoestimulantes, 3d-MPL, etc.

- 3dMPL (también conocido como monofosforilo lípido A 3 des-O-acilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) es un adyuvante en el que la posición 3 del extremo reductor glucosamina en el monofosforilo lípido A se ha desacilado. El 3D-MPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota* y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a bases. La preparación del 3dMPL se describió inicialmente en la referencia 110.

Reconstitución y envasado

5 Los componentes de antígeno liofilizado de la invención se reconstituirán en último término con un componente líquido para dar material adecuado para administrar a un paciente. Normalmente, la reconstitución tendrá lugar en el lugar de uso. Por tanto, un antígeno y un adyuvante de emulsión de aceite en agua se pueden conservar por separado en un kit de vacuna envasada o distribuida, preparada para formulación al final en el momento de usar.

10 En un kit que contiene dos contenedores, uno incluirá el líquido para reconstitución y el segundo contenedor incluye material liofilizado. El segundo contenedor normalmente estará herméticamente sellado. Normalmente, el líquido se introducirá en el segundo contenedor a través de una primera aguja, de modo que se reconstituye el material liofilizado en forma líquida. Después, se extraerá el líquido, normalmente en una jeringa, para administrar a un paciente. Esta etapa de extracción se puede realizar con la primera aguja, pero a menudo se realizará a través de una segunda aguja. La aguja usada para la extracción será la misma aguja que se usa después para la inyección a un paciente o puede ser diferente.

15 El segundo contenedor normalmente contendrá un vial. Una emulsión de aceite en agua para reconstituir el material liofilizado también se puede localizar en un vial, pero como alternativa se puede localizar en una jeringa. Una disposición adicional tiene los contenedores primero y segundo en cámaras separadas en una jeringa de cámara doble, de modo que, cuando se acciona, el material líquido se introduce desde el primer contenedor en el segundo contenedor. Los materiales mezclados y reconstituidos pueden salir de la jeringa en forma líquida. No obstante, en todos los casos, los materiales liofilizado y líquido se mantienen separados hasta que estén listos para mezclar.

20 Aunque, normalmente una emulsión de aceite en agua normalmente se usará en su forma líquida, en algunas realizaciones de la invención es posible usar un adyuvante liofilizado de emulsión de aceite en agua. La liofilización de los adyuvantes en emulsión de este modo se divulga en, por ejemplo, las referencias 105 y 111. Estas emulsiones secas también se reconstituyen en forma líquida en el momento de usar, por ejemplo usando un vehículo acuoso. Los componentes adyuvante liofilizado y el antígeno liofilizado pueden ser componentes de kit separados, pero, en algunas realizaciones, pueden estar mezclados (bien antes o bien después de la liofilización) en forma liofilizada. Por tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de una emulsión de aceite en agua liofilizada y una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno para producir una respuesta inmunitaria contra *Neisseria meningitidis*, serogrupo B. Esta composición liofilizada puede mezclarse con un vehículo acuoso para dar, en una etapa de reconstitución, una composición de Men-B con una emulsión de aceite en agua adyuvante.

30 Por tanto, un kit puede comprender, por ejemplo, dos viales, una jeringa precargada y un vial etc. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis o múltiples dosis. Por tanto, para las formas de múltiples dosis se prefieren los viales a las jeringas precargadas.

También se pueden añadir otros materiales líquidos y/o liofilizados antes de la administración a un paciente.

35 Un contenedor para un componente liofilizado puede tener una tapa (p. ej., un cierre de tipo Luer) adaptada de modo que se pueda insertar en la tapa una jeringuilla pre-cargada, expeler los contenidos de la jeringuilla hacia el interior del vial (p. ej., para reconstituir el material liofilizado en su interior) y de modo que los contenidos del vial se puedan volver a introducir en la jeringuilla. Tras la retirada de la jeringuilla del vial, se puede insertar una aguja y la vacuna se puede administrar a un paciente. La tapa está dentro de un sello o cubierta, de modo que el sello o cubierta ha de retirarse antes de poder acceder a la tapa.

40 Cuando un componente está envasado en un vial, éste estará hecho preferentemente de material de vidrio o plástico. Preferentemente, el vial se esteriliza antes de que el material se añada. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales pueden sellarse con un tapón sin látex. El vial puede incluir una dosis única de vacuna o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), *por ejemplo* 10 dosis. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

45 Cuando la vacuna está envasada en una jeringa, la jeringa puede tener fijada una aguja o puede no portar una aguja. Se puede suministrar una aguja aparte con la jeringa para montar y usar. Se prefieren las agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 2,54 cm y 0,61 mm, 2,54 cm y 0,51 mm y 1,6 cm y 0,51 mm. Las jeringas pueden proporcionarse con etiquetas que se pueden despegar en las que figurará impreso el número de lote y la fecha de caducidad de los contenidos, con el fin de facilitar el mantenimiento de un registro. Preferentemente, el émbolo de la jeringuilla tiene un tapón para evitar que el émbolo se saque accidentalmente durante la aspiración.

50 Cuando se usa un contenedor de vidrio (p. ej., una jeringuilla o un vial), se prefiere usar un contenedor hecho de vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

55 Dado que las vacunas normalmente se administran a los pacientes en dosis de 0,5 ml, el volumen del líquido en el primer contenedor será adecuado para administrar un volumen de dosis tras la reconstitución de al menos 0,5 ml, por ejemplo de 0,6 ml, que justifica el volumen de pérdidas.

Por motivos de estabilidad, el componente liofilizado de la invención puede incluir un estabilizante, tal como lactosa,

sacarosa y/o manitol, así como mezclas de los mismos, por ejemplo mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol etc. El uso de una mezcla de sacarosa/manitol puede acelerar el proceso de secado. Un componente liofilizado puede también incluir cloruro sódico. Los componentes adecuados en el material liofilizado se conservarán en la composición tras la reconstitución y, de este modo, las vacunas líquidas finales pueden contener, por tanto, lactosa y/o sacarosa.

Una composición puede incluir un agente de protección frente a la temperatura, como se describe en la referencia 112. Ejemplos incluyen glicerina, propilenglicol y/o polietilenglicol (PEG). PEG adecuados pueden tener un peso molecular medio que varía de 200-20.000 Da. En una realización preferida, el polietilenglicol puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 30 Da ('PEG-300').

10 **Composiciones farmacéuticas**

En última instancia, los materiales de la invención se usarán para preparar composiciones farmacéuticas para administrar aun paciente. Normalmente, estas incluirán un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la referencia 113 se puede encontrar una exhaustiva discusión de vehículos farmacéuticamente aceptables.

Se pueden establecer volúmenes de dosificación eficaces de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de aproximadamente 0,5 ml, por ejemplo para inyección intramuscular. La vacuna basada en VEM RIVM se administró en un volumen de 0,5 ml [114] mediante inyección intramuscular en el muslo o el antebrazo. MeNZB™ se administra en una dosis de 0,5 ml mediante inyección intramuscular en la parte anterolateral del muslo o la región deltoides del brazo. Se pueden usar dosis similares para otras vías de administración, por ejemplo una vacuna basada en VME intranasal para atomización puede tener un volumen de aproximadamente 100 µl o aproximadamente 130 µl por aerosol, con cuatro aerosoles administrados para dar una dosis total de aproximadamente 0,5 ml.

El pH tras la reconstitución estará, preferentemente, entre 6 y 8, y, más preferentemente, entre 6,5 y 7,5, (por ejemplo de aproximadamente 7). El pH de la vacuna basada en RIVM VME es 7,4 [115], y, para las composiciones, se prefiere un pH <7,5. La vacuna basada en RIVM VME mantiene el pH usando un tampón Tris/HCl 10 mM y un pH estable en las composiciones se puede mantener mediante el uso de un tampón, por ejemplo un tampón Tris, un tampón citrato, un tampón fosfato o un tampón histidina. Por tanto, las composiciones de la invención generalmente incluirán un tampón. Los componentes tampón se localizarán en el componente líquido y/o el componente liofilizado, según sea adecuado, para dar la disposición final tras la reconstitución según se desee.

La composición puede ser estéril y/o apirógena. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones para administración a pacientes son inmunogénicas y son, más preferentemente, composiciones vacunales. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), así como de cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se quiere decir que la administración de dicha cantidad a un individuo, bien en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía en función de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (p. ej., primate no humano, primate etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico encargado del tratamiento de la situación médica y otros factores relevantes. Cabe esperar que la cantidad entre dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina. El contenido de antígeno de las composiciones se expresará, generalmente, en términos de la cantidad de proteína por dosis. Una dosis de aproximadamente 0,9 mg de proteína por ml es típica para las vacunas intranasales basadas en VME.

Los meningococos afectan a varias zonas del cuerpo y, por tanto, las composiciones se pueden preparar en varias formas líquidas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar en forma de inyectables, bien como soluciones o suspensiones. La composición se puede preparar para administración pulmonar, por ejemplo en forma de un inhalador, usando un atomizador. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo en forma de gotas o aerosol. Son típicos los inyectables para administración intramuscular.

Las composiciones pueden incluir un antimicrobiano, particularmente envasado en formato de múltiples dosis. Los antimicrobianos, tales como tiomersal y 2-fenoxietanol se encuentran habitualmente en vacunas pero se prefiere usar un conservante sin mercurio o no usar ningún conservante.

Un componente liofilizado de la invención y/o una emulsión de aceite en agua adyuvante co-ensado pueden estar sustancialmente libres de sales de aluminio. Esta disposición permite que una composición reconstituida de la invención estén sustancialmente libres de sales de aluminio.

Las composiciones pueden comprender detergente, por ejemplo un Twwn (polisorbato), tal como Tween 80. Generalmente, los detergentes están presentes a niveles bajos, por ejemplo < 0,01%.

Las composiciones pueden incluir detergente residual (p. ej., desoxicolato) para preparación de VME. La cantidad de detergente residual es, preferentemente, inferior a 0,4 µg (más preferentemente, inferior a 0,2 µg) por cada µg de proteína MEN-B.

5 Las composiciones pueden incluir LOS de meningococos. La cantidad de LOS es, preferentemente, inferior a 0,12 µg (más preferentemente, inferior a 0,05 µg) por cada µg de proteína.

Las composiciones pueden incluir sales de sodio (p. ej., cloruro sódico) para dar tonicidad. Una concentración de 10 ± 2mg/ml de NaCl es típica, por ejemplo de aproximadamente 9 mg/ml.

Procedimientos de tratamiento

10 La invención se puede usar en un procedimiento para producir una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica líquida de la invención. Preferentemente, la respuesta inmunitaria es protectora y, preferentemente, implica la aparición de anticuerpos. El procedimiento puede producir una respuesta de refuerzo en un paciente que ya ha sido vacunado contra *N. meningitidis*. Los regímenes de primovacuna/refuerzo subcutáneos e intranasal para VME se divulgan en la ref. 116.

15 Preferentemente, el mamífero es un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es, preferentemente, un niño (p. ej., un niño pequeño o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es, preferentemente, un adulto. Una vacuna destinada a niños puede también administrarse a adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad etc.

20 Estos usos y procedimiento son, preferentemente, para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad producida por una *Neisseria meningitidis*, por ejemplo meningitis bacteriana (o, más específicamente, meningocócica) o septicemia.

25 Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por *Neisseria* tras la administración de la composición. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias contra los antígenos básicos tras la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones se puede determinar mediante su administración a sujetos de ensayo (p. ej., niños de 12-16 meses de edad o modelos animales [117]) y, después, determinando los parámetros estándar, incluidos los anticuerpos bactericidas en suero (ABS) y los títulos de ELISA (GMT). Estas respuestas inmunitarias generalmente se determinarán alrededor de meses después de la administración de la composición y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un incremento de los ABS de al menos 4 u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, se puede realizar más de una determinación postadministración.

35 En general, las composiciones pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos después de su administración a un sujeto. Estas respuestas se miden de forma conveniente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna. La actividad bactericida en suero (ABS) mide la muerte de bacterias mediada por el complemento y se puede analizar usando complemento humano o de cachorro de conejo. Las normas de la OMS requieren que una vacuna induzca al menos una elevación multiplicada por 4 de la ABS en más del 90% de los receptores. MeNZB™ produce un aumento de 4 veces la ABS 4-6 semanas después de la administración de la tercera dosis.

40 Las composiciones preferidas pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente sujeto humano que es superior al criterio para seroprotección para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado superior a lo que en un huésped se considera seroconversión contra al antígeno son bien conocidos y dichos títulos son publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente, más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertido, más preferentemente más del 90%, todavía más preferentemente más del 93% y, más preferentemente, 96-100%.

45 En general, las composiciones se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir mediante inyección parenteral (p. ej. por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido) o mediante cualquier vía adecuada. La invención se puede usar para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o el brazo. La inyección se puede realizar a través de una aguja (p. ej., una aguja hipodérmica) pero, como alternativa, se puede usar la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

50 La posología del tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. A un calendario de dosis primaria le puede seguir un calendario de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis iniciales (p. ej., entre 4-16 semanas) y entre la administración inicial y la de refuerzo se pueden determinar de forma rutinaria. La vacuna RIVM basada en VME se analizó usando un programa primario de 3 o 4 dosis, con vacunación a 0, 2 y 8 o 0, 1, 2 y 8 meses. MeNZB™ se administra en tres dosis a intervalos de seis semanas.

55

La composición se puede usar para inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra más de un linaje hipervirulento de meningococo. En concreto, pueden inducir, preferentemente, respuestas bactericidas contra dos o tres de los siguientes tres linajes hipervirulentos: (i) clúster A4; (ii) complejo ET5; y (iii) linaje 3. Adicionalmente pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra uno o más linajes hipervirulentos del subgrupo I, subgrupo iii, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y contra otros linajes, *por ejemplo* linajes hiperinvasivos. Esto no significa necesariamente que la composición pueda inducir anticuerpos bactericidas contra todas y cada una de las cepas de meningococo en estos linajes hipervirulentos, por ejemplo, en su lugar, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas del meningococo del serogrupo B en un linaje hipervirulento concreto, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos el 50% (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos de cepas preferidos incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los países siguientes: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. Preferentemente, el suero tiene un título bactericida de al menos 1024 (p. ej., 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o mayor, preferentemente al menos 2^{14}), es decir, el suero puede matar al menos el 50% de las bacterias de ensayo de una cepa concreta cuando está diluida al 1/1024.

Las composiciones útiles pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas siguientes de meningococo del serogrupo B: (i) del clúster A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21, 16) y/o cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5, cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) y/o cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o cepa BZ198 (B:NT:-). Las composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas 961-5945, 44/76 y 394/98.

Las cepas 561-5945 y G2136 son las dos cepas de referencia de *Neisseria* MLST [ids 638 y 1002 en la referencia 118]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (p. ej., ATCC BAA-335) y era la cepa que se secuenció en la referencia 119. La cepa 44/76 se ha usado ampliamente y se ha caracterizado (p. ej., ref. 120 y es una de las cepas de referencia *Neisseria* MLST [id 237 en la referencia 118; fila 32 de la Tabla 2 en la referencia 19]. Originalmente, la cepa 394/98 se aisló en Nueva Zelanda en 1998 y se han publicado varios estudios usando esta cepa (p. ej., ref. 121 y 122). La cepa BZ 198 es otra cepa de referencia MLST [id 409 en la referencia 118; fila 41 de la Tabla 2 en la referencia 19].

Otros componentes antigénicos

Además de contener antígenos de *N. meningitidis*, las composiciones pueden incluir antígenos de otros patógenos. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más de los antígenos adicionales siguientes:

- un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, tal como un sacárido (habitualmente conjugado).
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como el antígeno de superficie HBsAg.
- Un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.
- un antígeno de la difteria, tal como un toxoide de la difteria.
- un antígeno del tétanos, tal como un toxoide del tétanos.
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B ((Hib), normalmente conjugado).
- antígenos del poliovirus inactivados.

Estos antígenos adicionales pueden incluirse en forma líquida en el mismo contenedor que la emulsión de aceite en agua, en forma liofilizada en el mismo contenedor que el antígeno Men-B liofilizado o en un tercer contenedor (en forma liofilizada o, normalmente, en forma líquida).

Cuando un antígeno de difteria está incluido en la composición, también se prefiere incluir los antígenos del tétanos y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno del tétanos está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno de pertussis está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y del tétanos. Por tanto, se prefieren las combinaciones de DTP.

Si se incluye un sacárido de Hib (normalmente un conjugado), el resto sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (p. ej., polirribosilribitol fosfato de longitud completa (PRP)purificado de la bacteria), pero también es posible fragmentar el sacárido purificado para formar oligosacáridos (p. ej., PM de ~ 1 a ~ 5 kDa), por ejemplo mediante hidrólisis. La concentración del conjugado de Hib en una vacuna reconstituida normalmente estará en el intervalo de 0,5 µg a 50 µg, por ejemplo de 1-20 µg, de 10-15 µg, de 12-16 µg, etc. La cantidad puede ser de aproximadamente 15g, o de aproximadamente 12,5 µg en algunas realizaciones. Una masa inferior a 5 µg puede ser adecuada [123], por ejemplo en el intervalo de 1-5 µg, 2-4 µg, o de aproximadamente 2,5 µg. Como se ha descrito anteriormente, en combinaciones que incluyen sacárido de Hib y sacáridos meningocócicos, la dosis del primero se puede seleccionar en base a la dosis del último (en concreto, con múltiples serogrupos meningocócicos, su masa media). Otras características de los conjugados de Hib son como se ha divulgado anteriormente para los conjugados meningocócicos, incluida la elección de la proteína vehículo (p. ej., CRM197 o el toroide del tétanos), enlaces,

proporciones etc.

Si se incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, éste puede ser un polipéptido o un sacárido. Los sacáridos capsulares conjugados son particularmente útiles para inmunizar contra neumococos. El sacárido puede ser un polisacárido que tenga el tamaño que se produzca durante la purificación del sacárido de las bacterias, o puede ser un oligosacárido obtenido mediante fragmentación de dicho polisacárido. En el producto heptavalente PREVNAR™, 6 de los sacáridos se presentan como polisacáridos intactos, mientras que uno (el serotipo 18C) se presenta como un oligosacárido. Una composición puede incluir un sacárido capsular de uno o más de los siguientes serotipos neumocócicos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y/o 33F. Una composición puede incluir múltiples serotipos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más serotipos. Las combinaciones de conjugados heptavalente, nonavalente, decavalente, undecavalente y tridecavalente ya se conocen en la técnica, como también una combinación 23-valente sin conjugar. Por ejemplo, una combinación decavalente puede incluir sacárido de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una combinación undecavalente puede incluir además sacárido del serotipo 3. Una combinación dodecavalente puede añadirse a la mezcla decavalente. serotipos 6A y 19A; 6A y 22F; 19A y 22F; 6A y 15B; 19A y 15B; r 22F y 15B; una combinación tridecavalente puede añadir a la mezcla undecavalente: Los serotipos 19A y 22F; 8 y 12F; 8 y 15B; 8 y 19A; 8 y 22F; 12F y 15B; 12F y 19A; 12F y 22F; 15B y 19A; 15B y 22F. etc. Otras características de los conjugados neumocócicos son como se ha divulgado anteriormente para conjugados meningocócicos, incluida la elección de la proteína vehículo (p. ej., CRM197 o el toxide del tétanos), enlaces, proporciones etc. Cuando una composición incluye más de un conjugado, cada conjugado puede usar la misma proteína vehículo o una proteína vehículo diferente. La referencia 124 describe posibles ventajas a la hora de usar proteínas vehículo diferentes en vacunas conjugadas neumocócicas multivalentes.

Generalidades

El término “que comprende” abarca “que incluye” además de “que consiste en”, *por ejemplo* una composición “que comprende” X puede consistir en sólo por X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo* X + Y.

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, *por ejemplo*, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra dos trazas analíticas superpuestas para una composición de la invención. Las líneas son una composición antes de la liofilización y después de la reconstitución. Esencialmente, solo se ve una línea porque son muy similares.

La Figura 2 muestra dos trazas analíticas superpuestas para una composición almacenada a 4 °C y una composición almacenada a 37 °C. Al contrario que la Figura 1 se pueden ver dos líneas.

La Figura 3 muestra un análisis SDS-PAGE de varias formulaciones. Los 10 carriles, de izquierda a derecha, muestran: (1) marcador de PM; (2)-(4) antígenos líquidos a 100 µg/ml, 50 µg/ml y 25 µg/ml; (5) antígenos en mezcla de 2% de manitol y 3% de sacarosa, antes de la liofilización; (6) como el carril (5), pero tras la liofilización y reconstitución con WFI; (7) como el carril (5), pero tras la liofilización y reconstitución con MF59; (8) a (10) como los carriles (5) a (7), pero en sacarosa al 5%.

Modos para realizar la invención

Inclusión de adyuvante en la vacuna Men-B

La evaluación preclínica inicial de la vacuna Men-B de Novartis indicó que una respuesta inmunitaria óptima requería la presencia de hidróxido de aluminio adyuvante. No obstante, incluso en presencia de este adyuvante, la cobertura de cepa fue incompleta. Por ejemplo, aunque el 100 % de las cepas ST32 y ST8 analizadas moría por el suero producido por la vacuna, esta cifra descendía al 65 % para las cepas ST11. Por el contrario, el uso de la emulsión MF59 como adyuvante proporcionó una cobertura del 100 % para todas las cepas ST32, ST8 y ST11. Otros experimentos confirmaron la superioridad de MF59.

La misma superioridad se observó cuando se añadieron sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos A, C, W135 e Y a la vacuna Men-B. La inmunogenicidad alcanzada mediante esta vacuna A-B-C-W-Y era mejor usando MF59 que cuando se usó hidróxido de aluminio, tanto en términos de títulos bactericidas y cobertura de cepas.

Por tanto, M59 proporciona una eficacia inmunogénica potenciada en comparación con el hidróxido de aluminio adyuvante. No obstante, cuando se analizó su estabilidad, se descubrió que los antígenos Men-B estaban comenzando a degradarse después de aproximadamente 12 semanas, incluso cuando se almacenaron a 4 °C. Cuando se almacenaron a temperaturas mayores, la degradación fue evidente ya a las 2 semanas, y la degradación

completa se observó a los 6 meses. El análisis usando el analizador Agilent 3100 Bioanalyzer o cromatografía de exclusión por tamaño confirmó la degradación. Por el contrario, los antígenos permanecieron estables cuando se adsorbieron sobre hidróxido de aluminio.

5 También se vio menor estabilidad para los sacáridos capsulares conjugados procedentes de serogrupos distintos al B en MF59. El nivel de ácido siálico libre (un componente en los sacáridos capsulares de Men-C, Men-W135 and Men-Y) aumentó de forma gradual en una formulación con MF59 como adyuvante almacenada a 4 °C, y alcanza aproximadamente el 15 % tras 6 meses. No obstante, a temperaturas más altas, el nivel libre alcanzó el 50 % tras aproximadamente 10 semanas y el 100 % (es decir, degradación total) en 6 meses.

10 Por tanto, la inmunogenicidad potenciada alcanzada por MF59 se consigue a expensas de la estabilidad durante el almacenamiento. Se realizaron trabajos para ver si se podía conseguir una formulación estable durante el uso de MF59 y/o sin requerir adsorción en un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Liofilización de Men-B

15 En un intento de alcanzar el objetivo de estabilidad se liofilizaron los antígenos de Men-B. Tras la reconstitución, se confirmó que conservaban su eficacia. Además, la estabilidad se observó en las mezclas de antígenos Men-B cuando se conjugan con sacáridos capsulares conjugados de cada uno de los serogrupos A, C, W135 e Y.

20 Por ejemplo, la Figura 1 muestra las trazas analíticas superpuestas, con los picos correspondientes a las posiciones de la elución de las proteínas Men-B. Las trazas son casi idénticas, lo que no revela cambios físicoquímicos. Por el contrario, la Figura 2 muestra dos trazas analíticas superpuestas de la misma composición almacenada a 4 °C o a 37 °C y los cambios son fácilmente visibles. Otras técnicas analíticas confirmaron la ausencia de cualquier cambio detectable antes y después de la liofilización. La integridad de los antígenos de Men-B individuales parece estar conservada incluso tras 6 meses de almacenamiento a 4 °C tras la liofilización.

Las composiciones se habían liofilizado en presencia de manitol a 4,5 % y sacarosa al 1,5 %.

25 Por tanto, la estabilidad a largo plazo de los antígenos meningocócicos se puede conseguir sin necesidad de adsorción a una sal de aluminio. Por tanto, la liofilización permite que se usen los antígenos en combinación con una emulsión de aceite en agua, proporcionando de este modo la mayor eficacia y cobertura de cepas que se ha demostrado para estos adyuvantes al tiempo que se evitan los problemas de estabilidad asociados.

Formulaciones adicionales

30 En trabajos de desarrollo adicionales para una presentación liofilizada de la vacuna Men-B se prepararon dos formulaciones de la vacuna de proteína recombinante. Ambas usaron sacarosa como estabilizante de la liofilización, pero una incluyó también manitol. La osmolaridad es 300 mOsmU y el pH es 7,0. cada vial incluye material suficiente para una dosis humana con un 40 % de exceso (70 µg de cada proteína recombinante, 15 mg de PBS y 14 mg de manitol o 21 mg de manitol + 35 mg de sacarosa) y se reconstituirá con 700 µl de agua de MF59 (o, para comparación, con WFI).

35 Los niveles de humedad se midieron inmediatamente después de la liofilización y, después, durante un mes a temperaturas bajas o elevadas. El contenido en humedad permaneció constante a aproximadamente 1,1 %.

40 Una comparación de las trazas de RP-HPLC antes de la liofilización y después de la reconstitución mostró que las proteínas en ambas formulaciones permanecían estables tras la liofilización incluso durante 1 mes a 37 °C. El SDS-PAGE (Figura 3) y las transferencias Western también mostraron que las tres proteínas eran estables tras el proceso de liofilización, sin signos de degradación o agregación tras la reconstitución con MF59 o WFI a 4 °C y a 37 °C. El análisis Experion dio el mismo resultado. La cromatografía de exclusión por tamaño mostró que la liofilización producía un pequeño incremento de la agregación, pero la cantidad de agregado no aumentó después, ni siquiera tras 3 meses a 37 °C o 6 meses a 4 °C.

Estudios de inmunogenicidad

45 Se usaron ratones en un estudio de inmunogenicidad para evaluar el efecto de la liofilización sobre la potencia de la vacuna. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron con MF59 y los títulos se compararon contra los mismos antígenos en forma líquida y se mezclaron de forma extemporánea con MF59 (como en un enfoque de “dos viales”). Las formulaciones indujeron títulos similares.

50 Para estudiar la estabilidad a más largo plazo, dos preparaciones de antígeno liofilizadas (una liofilizada con sacarosa, la otra con sacarosa + manitol) se almacenaron a 4 °C y sus inmunogenicidades se analizaron tras de 3 a 6 meses de almacenamiento. Los antígenos almacenados se reconstituyeron con MF59 (también se almacenaron a 4 °C con los antígenos) y se usaron rápidamente para inmunización. Para comparación, los antígenos acuosos recién preparados y MF59 también se mezclaron y analizaron en paralelo.

Los resultados de ELISA de dos estudios separados indicaron que las formulaciones liofilizadas, cuando se reconstituyeron con MF59, indujeron títulos de anticuerpos (GMT) similares a los producidos por la formulación

recién preparada. Lo mismo se observó cuando se evaluó la ABD de las respuestas de anticuerpos, por ejemplo un título de ABS DE 32678 se observó a tiempo cero con el antígeno liofilizado con sacarosa, y se siguió observando tras 6 meses de almacenamiento. Por tanto, los antígenos de Men-B permanecen activos tras la liofilización y almacenamiento.

- 5 En otros estudios, las preparaciones liofilizadas se almacenaron a 4 °C o a 37 °C y se evaluó la inmunogenicidad. Incluso tras 1 mes de almacenamiento a 37 °C, los antígenos liofilizados no mostraron pérdida alguna de la actividad de ABS.

Estabilidad por tamaño de la emulsión mezclada con los antígenos liofilizados de Men-B

- 10 El tamaño de la gota de aceite de una emulsión de MF59 se midió en un periodo de 24 horas a 4 °C y a 25 °C, bien como emulsión sola o mezclados con antígenos Men-B liofilizados o mezclados con un antígeno control. Los tamaños de las gotas (nm) fueron los siguientes:

Temp (°C):	25				4	
Tiempo (h):	0	3	5	24	0	24
MF59 solo	171	169	172	168	172	170
MF59 + Ag control	173	170	167	172	169	172
MF59 + Men-B _{lyo}	169	168	176	170	173	171

- 15 Por tanto, el tamaño de partícula de la emulsión en presencia de los antígenos de Men-B liofilizados es estable durante 24 horas a 4 °C o a 25 °C y es, esencialmente, el mismo que la emulsión sola.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo únicamente y que se pueden realizar modificaciones.

Referencias

- 20 [1] Giuliani y col. (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103(29):10834-9.
 [2] Boutriau y col. (2007) Clin Vaccin Immunol 14:65-73.
 [3] Documento WO99/61053.
 [4] Documento WO00/50075.
 [5] Documento WO2006/100109
 [6] Shi & Schofield (2004) Exp Opin Drug Safety 3:153-8.
 25 [7] Belshe y col. (1998) AIDS. 12(18):2407-15.
 [8] Arigita y col. (2004) Vaccine 22:629-42.
 [9] Granoff y col. (1997) Infect Immun 65:1710-5.
 [10] Documento WO02/09643.
 [11] Katial y col. (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
 30 [12] Patente de EE.UU. 6.180.111.
 [13] Documento WO01/34642.
 [14] Documento WO2004/019977
 [15] Patente europea 0011243.
 [16] Fredriksen y col. (1991) NIPH Ann. 14(2):67-80.
 35 [17] Documento WO01/91788.
 [18] Documento WO2005/004908
 [19] Maiden y col. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
 [20] Documento WO98/56901.
 [21] Documento WO2006/081259
 40 [22] Claassen y col. (1996) 14(10):1001-8.
 [23] Documento WO99/10497.
 [24] Steeghs y col. (2001) The EMBO Journal 20:6937-6945.
 [25] Documento WO00/35811.
 [26] Documento WO01/09350.
 45 [27] Documento WO02/09746.
 [28] Documento WO02/062378.
 [29] Documento WO2004/014417.
 [30] Documento WO03/105890.
 [31] Documento WO2006/024946

- [32] Documento WO99/24578.
 [33] Documento WO99/36544.
 [34] Documento WO99/57280.
 [35] Documento WO00/22430.
 5 [36] Documento WO96/29412.
 [37] Documento WO01/64920.
 [38] Documento WO03/020756.
 [39] Documento WO2004/048404.
 [40] Documento WO2004/032958.
 10 [41] Documento WO98/53851
 [42] Documento US-6531131
 [43] Documento WO00/26384.
 [44] Documento US-6645503
 [45] Documento WO01/52885.
 15 [46] Costantino y col. (1992) Vaccine 10:691-8.
 [47] Lieberman y col. (1996) JAMA 275:1499-503.
 [48] Documento WO02/058737.
 [49] Documento WO03/007985.
 [50] Rennels y col. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.
 20 [51] Campbell y col. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.
 [52] Documento WO03/080678.
 [53] Glode y col. (1979) J Infect Dis 139:52-56
 [54] Documento WO94/05325; US patent 5,425,946.
 [55] Arakere & Frasch (1991) Infect. Immun. 59:4349-4356.
 25 [56] Michon y col. (2000) Dev. Biol. 103:151-160.
 [57] Rubinstein & Stein (1998) J. Immunol. 141:4357-4362.
 [58] Documento WO2005/033148
 [59] Documento WO2007/000314.
 [60] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
 30 [61] Documento EP-A-0372501.
 [62] Documento EP-A-0378881.
 [63] Documento EP-A-0427347.
 [64] Documento WO93/17712
 [65] Documento WO94/03208.
 35 [66] Documento WO98/58668.
 [67] Documento EP-A-0471177.
 [68] Documento WO91/01146
 [69] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
 [70] Baraldo y col. (2004) Infect Immunol 72(8):4884-7.
 40 [71] Documento EP-A-0594610.
 [72] Ruan y col. (1990) J Immunol 145:3379-3384.
 [73] Documento WO00/56360.
 [74] Kuo y col. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
 [75] Michon y col. (1998) Vaccine. 16:1732-41.
 45 [76] Documento WO02/091998.
 [77] Documento WO01/72337
 [78] Documento WO00/61761.
 [79] Documento WO00/33882
 [80] Documento WO99/42130
 50 [81] Documento WO2007/000341.
 [82] Bardotti y col. (2008) Vaccine 26:2284-96.
 [83] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
 [84] Documento EP-A-0208375
 [85] Bethell G.S. y col., J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4
 55 [86] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
 [87] Documento WO00/10599
 [88] Gever y col., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
 [89] Patente de EE.UU. 4,057,685.
 [90] Patentes de EE.UU 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
 60 [91] Patente de EE.UU. 4,459,286.
 [92] Patente de EE.UU. 5,204,098
 [93] Patente de EE.UU. 4,965,338
 [94] Patente de EE.UU. 4,663,160.
 [95] Documento WO2007/000343.
 65 [96] Documento WO2007/000342.
 [97] Documento WO2007/000322.

- [98] Documento WO90/14837.
 [99] Pod Da & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
 [100] Pod Da (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
 [101] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [102] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [103] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
 [104] Hariharan y col. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
 [105] Documento US-2007/014805.
 [106] Documento WO95/11700.
 [107] Patente de EE.UU. 6,080,725.
 [108] Documento WO2006/113373.
 [109] Documento WO2005/097181.
 [110] Documento GB-A-2220211.
 [111] Documento US-5472706
 [112] Documento WO2006/110603.
 [113] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
 [114] RIVM report 124001 004.
 [115] RIVM report 000012 003.
 [116] Bakke y col. (2001) Infect. Immun. 69:5010-5015.
 [117] Documento WO01/30390.
 [118] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
 [119] Tettelin y col. (2000) Science 287:1809-1815.
 [120] Pettersson y col. (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
 [121] Welsch y col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.
 [122] Santos y col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of N. meningitidis.
 [123] Documento WO2007/000327.
 [124] Documento WO2007/071707

Listado de secuencias

- <110> NOVARTIS AG
 <120> FORMULACIONES DE VACUNAS MENINGOCÓCICAS
 <130> P051966WO
 <140> PCT/IB2008/_
 <141> 2008-10-17
 <150> US-60/999,590
 <151> 2007-10-19
 <160> 7
 <170> SeqWin99, version 1.02
 <210> 1
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 1

ES 2 383 231 T3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
 20 25 30
 Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 35 40 45
 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His
 85 90 95
 Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His
 100 105 110
 Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala
 115 120 125
 Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr
 130 135 140
 Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr
 145 150 155 160
 Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His
 165 170 175
 Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys
 180 185 190
 Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn
 195 200 205
 Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala
 210 215 220
 Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg
 225 230 235 240
 His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 245

<210> 2

<211> 247

5 <212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 2

ES 2 383 231 T3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
 20 25 30
 Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 35 40 45
 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His
 85 90 95
 Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys
 100 105 110
 Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly
 115 120 125
 Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr
 130 135 140
 His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr
 145 150 155 160
 Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu
 165 170 175
 Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala
 180 185 190
 Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser
 195 200 205
 Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln
 210 215 220
 Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu
 225 230 235 240
 Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245

<210> 3

<211> 250

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser
 20 25 30
 Ile Pro Gln Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 35 40 45

ES 2 383 231 T3

Thr Phe Lys Ala Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu
 50 55 60
 Lys Asn Asp Lys Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val
 65 70 75 80
 Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys
 85 90 95
 Gln Asn His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn
 100 105 110
 Pro Asp Lys Thr Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser
 115 120 125
 Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys
 130 135 140
 Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg
 145 150 155 160
 Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile
 165 170 175
 Glu His Leu Lys Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu
 180 185 190
 Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg
 195 200 205
 Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp
 210 215 220
 Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys
 225 230 235 240
 Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 4

<211> 644

5 <212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 4

ES 2 383 231 T3

Met	Ala	Ser	Pro	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Ala
1				5					10					15	
Ala	Pro	Val	Val	Ser	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Pro
		20						25					30		
Gln	Ala	Gly	Ser	Gln	Gly	Gln	Gly	Ala	Pro	Ser	Ala	Gln	Gly	Gly	Gln
		35					40					45			
Asp	Met	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Ala
	50					55					60				
Ala	Thr	Asp	Lys	Pro	Lys	Asn	Glu	Asp	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Asp	Met
65					70					75					80
Pro	Gln	Asn	Ala	Ala	Asp	Thr	Asp	Ser	Leu	Thr	Pro	Asn	His	Thr	Pro
				85					90					95	
Ala	Ser	Asn	Met	Pro	Ala	Gly	Asn	Met	Glu	Asn	Gln	Ala	Pro	Asp	Ala
			100					105					110		
Gly	Glu	Ser	Glu	Gln	Pro	Ala	Asn	Gln	Pro	Asp	Met	Ala	Asn	Thr	Ala
		115					120					125			

ES 2 383 231 T3

Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly
 130 135 140
 Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala
 145 150 155
 Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser
 165 170 175
 Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
 180 185 190
 Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
 195 200 205
 Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe
 210 215 220
 Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly
 225 230 235 240
 Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser
 245 250 255
 Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys
 260 265 270
 Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
 275 280 285
 Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
 290 295 300
 Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile
 305 310 315 320
 Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
 325 330 335
 Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys
 340 345 350
 Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
 355 360 365
 Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala
 370 375 380
 Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 405 410 415
 Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
 420 425 430
 Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 435 440 445
 Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460
 Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys
 465 470 475 480
 Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495

ES 2 383 231 T3

Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510
 Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
 515 520
 Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540
 Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
 545 550 555 560
 Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
 565 570 575
 Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
 580 585 590
 Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
 595 600 605
 Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620
 Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640
 Ala Ala Lys Gln

<210> 5

<211> 434

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 5

ES 2 383 231 T3

Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala
1 5 10 15
Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala
20 25 30
Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln
35 40 45
Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asn Arg His
50 55 60
Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val
65 70 75 80
Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr
85 90 95
Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp
100 105 110
Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro
115 120 125
Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr
130 135 140
Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys
145 150 155 160
Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn
165 170 175
Tyr Val Gln Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly

ES 2 383 231 T3

180					185					190					
Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Leu	Asp	His	Lys	Asp	Lys
		195					200					205			
Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Val	Arg	Lys	Asn	Glu	Lys
	210					215					220				
Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp
225					230					235					240
Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Asn	Asp	Lys	Val	Ser	Arg	Phe	Asp
				245					250					255	
Phe	Ile	Arg	Gln	Ile	Glu	Val	Asp	Gly	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Glu	Ser
			260					265					270		
Gly	Glu	Phe	Gln	Val	Tyr	Lys	Gln	Ser	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe
		275					280					285			
Gln	Thr	Glu	Gln	Ile	Gln	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Gly	Lys	Met	Val	Ala
	290					295					300				
Lys	Arg	Gln	Phe	Arg	Ile	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Glu	His	Thr	Ser	Phe
305					310					315					320
Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	Gly	Gly	Arg	Ala	Thr	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	Phe
				325					330					335	
Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Asp	Phe	Ala
			340					345					350		
Ala	Lys	Gln	Gly	Asn	Gly	Lys	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Ser	Pro	Glu	Leu
		355					360					365			
Asn	Val	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	His
	370					375					380				
Ala	Val	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Gln	Ala	Glu	Lys	Gly	Ser
385					390					395					400
Tyr	Ser	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Lys	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Ser
				405					410					415	
Ala	Glu	Val	Lys	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala
			420					425					430		
Lys	Gln														

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 6

ES 2 383 231 T3

Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala
1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu
20 25 30

Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala
35 40 45

Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys
50 55 60

Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn
65 70 75 80

Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr
85 90 95

Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala
100 105 110

Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr
115 120 125

Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys
130 135 140

Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn
145 150 155 160

Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala
165 170 175

Val Lys Thr Ala Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln
180 185 190

Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala
210 215 220

Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys
225 230 235 240

Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu
245 250 255

Glu Ser Asp Ser Lys Phe Val Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr
260 265 270

Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp
275 280 285

His Asp Thr Arg Leu Asn Gly Leu Asp Lys Thr Val Ser Asp Leu Arg
290 295 300

Lys Glu Thr Arg Gln Gly Leu Ala Glu Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu
305 310 315 320

Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly
325

ES 2 383 231 T3

<210> 7
<211> 434
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

5 <400> 7

Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala
1 5 10 15
Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala
20 25 30
Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln
35 40 45
Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asp Arg His
50 55 60
Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val

ES 2 383 231 T3

65			70				75				80				
Gly	Gln	Ile	Ala	Arg	Ser	Glu	Gln	Ala	Ala	Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Tyr
				85					90					95	
Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Asp
			100					105					110		
Thr	Trp	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro
		115					120					125			
Ala	Thr	Arg	Ala	Arg	Val	Lys	Ile	Val	Thr	Tyr	Gly	Asn	Val	Thr	Tyr
	130					135					140				
Val	Met	Gly	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Gln	Ala	Gln	Ile	Thr	Gln	Lys
145					150					155					160
Val	Ser	Thr	Thr	Val	Gly	Val	Gln	Lys	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gln	Asn
				165					170					175	
Tyr	Val	Gln	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly
			180					185					190		
Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Leu	Asp	His	Lys	Asp	Lys
		195					200					205			
Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Val	Arg	Lys	Asn	Glu	Lys
	210					215					220				
Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp
225					230					235					240
Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Asn	Asp	Lys	Val	Ser	Arg	Phe	Asp
				245					250					255	
Phe	Ile	Arg	Gln	Ile	Glu	Val	Asp	Gly	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Glu	Ser
			260					265					270		
Gly	Glu	Phe	Gln	Val	Tyr	Lys	Gln	Ser	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe
		275					280					285			
Gln	Thr	Glu	Gln	Ile	Gln	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Gly	Lys	Met	Val	Ala
	290					295					300				
Lys	Arg	Gln	Phe	Arg	Ile	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Glu	His	Thr	Ser	Phe
305					310					315					320
Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	Gly	Gly	Arg	Ala	Thr	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	Phe
				325					330					335	
Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Asp	Phe	Ala
			340					345					350		
Ala	Lys	Gln	Gly	Asn	Gly	Lys	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Ser	Pro	Glu	Leu
		355					360					365			
Asn	Val	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	His
	370					375					380				
Ala	Val	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Gln	Ala	Glu	Lys	Gly	Ser
385					390					395					400
Tyr	Ser	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Lys	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Ser
				405					410					415	
Ala	Glu	Val	Lys	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala
			420					425					430		
Lys	Gln														

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende: (i) un primer contenedor que contiene un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua; y (ii) un segundo contenedor que contiene una composición antigénica liofilizada que comprende un inmunógeno para producir una respuesta inmunitaria contra *Neisseria meningitidis*, serogrupo B.
- 5 2. El kit de la reivindicación 1, en el que la composición antigénica liofilizada en el segundo contenedor comprende además un sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*.
3. El kit de la reivindicación 2, en el que la composición antigénica liofilizada está sustancialmente libre de sales de aluminio.
- 10 4. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición antigénica liofilizada y/o la emulsión adyuvante está/n sustancialmente libres de sales de aluminio.
5. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición antigénica liofilizada comprende vesículas de membrana de una cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*.
6. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición antigénica liofilizada comprende proteínas recombinantes de una cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*.
- 15 7. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición antigénica liofilizada comprende un lipooligosacárido de una cepa del serogrupo B de *N. meningitidis*.

Figura 1

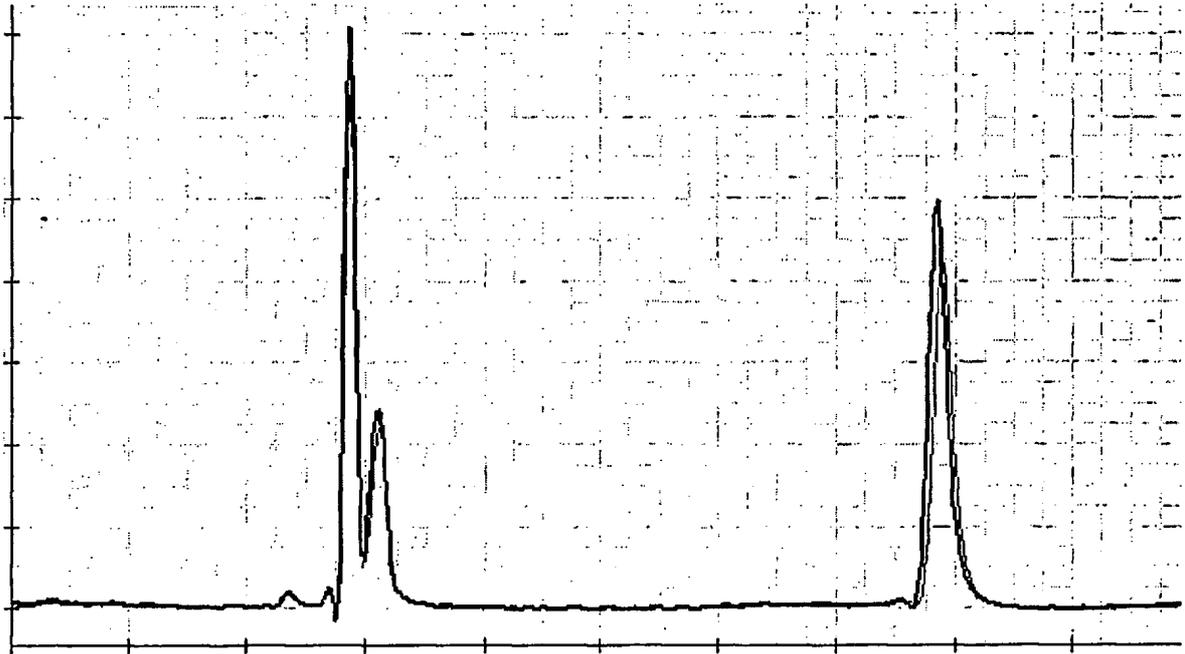


Figura 2

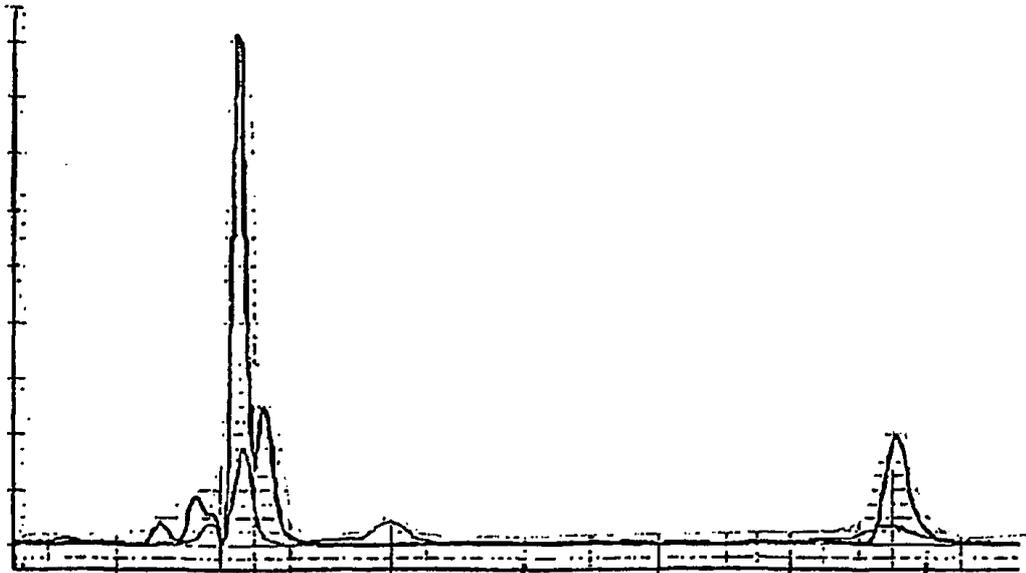


Figura 3

