



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 197 688**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **99954130 .3**
96 Fecha de presentación : **02.11.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1126874**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2001**

54 Título: **Vacuna meningocócica multicomponente.**

30 Prioridad: **02.11.1998 GB 9823978**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.01.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.12.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.12.2008**

73 Titular/es: **Health Protection Agency
Porton Down
Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, GB**

72 Inventor/es: **Robinson, Andrew;
Gorringe, Andrew R.;
Hudson, Michael John y
Reddin, Karen M.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 197 688 T5

DESCRIPCIÓN

Vacuna meningocócica multicomponente.

5 La presente invención se refiere a una vacuna multicomponente y a métodos para preparar una vacuna multicomponente que confiere inmunidad protectora a un amplio espectro de infección por agentes patógenos Gram-negativos. En particular la presente invención se refiere a una vacuna multicomponente que proporciona inmunidad protectora tanto activa como pasiva para la enfermedad meningocócica.

10 La meningitis meningocócica es un problema importante en todo el mundo y en muchos países está creciendo la incidencia de la infección. La *Neisseria meningitidis* es el agente causante de la enfermedad y también es responsable de la septicemia meningocócica, la cual está asociada a una rápida aparición y alta mortalidad, siendo de consecuencias fatales el 22% de los casos.

15 Actualmente las vacunas dirigidas a proporcionar inmunidad protectora contra la enfermedad meningocócica sólo proporcionan una protección limitada, debido a las muchas cepas diferentes de *N. meningitidis*. Las vacunas basadas en antígenos del grupo sérico, los polisacáridos capsulares, ofrecen sólo protección de corta duración contra la infección y no protegen contra muchas cepas encontradas en Norteamérica y Europa. Otro inconveniente de estas vacunas es que confieren bajos niveles de protección a niños de edad inferior a 2 años, uno de los grupos más vulnerables que son
20 comúnmente susceptible de infección.

El receptor de la transferrina meningocócica esta hecho de dos tipos de cadena proteica componente, la proteína de fijación a transferrina A (denominada abreviadamente TbpA, por sus iniciales en inglés *Transferrin binding protein* A) y análogamente TbpB. El receptor complejo se cree que está formado por un dímero de TbpA que se asocia con
25 una sola TbpB (Boulton *et al.* (1988)). De los epítomos presentes en TbpA se sabe que están enmascarados dentro del interior de la proteína (Ala'Aldeen (1996)). Las vacunas contra la meningitis meningocócica a base de TbpB de una sola cepa muestran algo de reactividad cruzada y hay pruebas de una respuesta inmune de reacción cruzada en conejos inmunizados con TbpB sola (Ferreirós *et al.* (1998)).

30 Gómez *et al.* (Vaccine Vol. 16 (1998) Nº 17 pp. 1633-1639) describe un estudio sobre los efectos de cierto número de diferentes composiciones adyuvantes en vacunas que comprenden el complejo TbpA + TbpB. Las tasas de inmunización frente a la inoculación meningocócica fueron más elevadas en las composiciones que contenían TbpA + TbpB y adyuvante RAS.

35 Ala'Aldeen (J. Med. Microbiol. Vol. 44 (1996) pp. 237-243) aporta una revisión de las Tbp de *N. meningitidis* y sus uso potencial como candidatos de antígenos para vacunas. Ala'Aldeen sugiere que la reactividad cruzada y la protección de amplio espectro está asociada principalmente a la subunidad TbpB (página 240, tercer párrafo).

40 Gorringer *et al.* (Vaccine, Vol. 13 (1995) nº13 págs. 1207-1212) describen la respuesta de anticuerpos humanos a Tbp y evalúan su valor como antígenos para vacunas sometiendo a ensayo sueros humanos en cuanto a anticuerpos antiTbp. Gorringer *et al.* no describen los componentes de tal vacuna, pero investigan los niveles de la reactividad cruzada de los anticuerpos entre subunidades TbpA y TbpB purificadas y el complejo TbpA-B.

45 Boulton *et al.* (Biochem.J. (1998) 334, pp. 269-273) describen el aislamiento y caracterización de TbpB procedente de *N. meningitidis* y también postulan que la forma completa del complejo Tbp *in vivo* es un dímero de TbpA más un monómero de TbpB.

No obstante sería ventajoso proporcionar una vacuna que confiera una amplia gama de inmunidad protectora frente a la infección a partir de un amplio espectro de cepas de *N. Meningitidis*. Además sería ventajoso proporcionar una
50 vacuna que confiera inmunidad protectoras a niños así como a adultos y cuya protección sea a largo plazo. También sería ventajoso proporcionar una vacuna que protegiera contra la infección subclínica, es decir, cuando no son inmediatamente evidentes los síntomas de infección meningocócica porque los individuos afectados pueden actuar como portador del agente patógeno.

55 Es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones que contienen Tbp, y vacunas basadas en dichas proteínas, que superen o al menos mejoren las desventajas que presentan las de la técnica anterior. Particularmente es un objeto de la invención proporcionar una composición de vacuna que fiablemente induzca inmunidad protectora frente a la infección meningocócica.

60 Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende vesículas de la membrana exterior de *N. Meningitidis* enriquecida con una proteína de fijación a transferrina (Tbp).

La composición puede combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo el adyuvante aluminio, aunque es adecuado cualquier vehículo conveniente para administración oral, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, o cualquier otra ruta de administración para producir una composición farmacéutica para el tratamiento de la
65 enfermedad meningocócica.

La vacuna puede comprender ambas proteínas TbpA + B preferiblemente en una relación molar entre 1,8 y 2,2 moléculas de TbpA a una molécula de TbpB, más preferiblemente 2 moléculas de TbpA a una de TbpB. Sorprendentemente esta combinación particular de componentes puede proporcionar mayor inmunidad protectora frente a la infección meningocócica en comparación con la vacunación con TbpB sola. Una combinación 1:1 de A:B es más protectora contra la inoculación que B sola. Esto es sorprendente puesto que la TbpA se ha considerado previamente como no protectora. Los actuales resultados difieren de la visión establecida con algunos experimentos (descritos con más detalle a continuación) que muestran que, cuando se administra como vacuna, la TbpA también es capaz de proporcionar inmunidad protectora de la infección meningocócica. Sin embargo, los actuales resultados demuestran del modo más convincente el comportamiento coherente de vacunas que comprenden ambas TbpA y TbpB comparadas con las que contienen TbpA o B solas. Es esta falta de variabilidad entre las composiciones y el nivel consistentemente alto de protección frente a la infección inducida como respuesta a la vacunación con Tbp A+B lo que permite a las composiciones de la invención demostrar ventajas significativas sobre las vacunas de la técnica anterior.

Se sabe que las proteínas de fijación a transferrina están localizadas en las membranas exteriores de cierto número de bacterias gram-negativas, tales como *N. meningitidis*. Las formulaciones de la composición de la presente invención con vehículos o adyuvantes convencionales proporcionan una composición para tratar la infección producida por estas bacterias.

Es una ventaja que tras la administración de una composición se puedan producir anticuerpos contra epítopos que consistan en secuencias de TbpA y TbpB en yuxtaposición. De este modo puede mejorarse la respuesta inmune obtenible usando dicha composición en comparación con la que resulta de las composiciones de vacuna de la técnica anterior que comprenden solamente un componente del complejo Tbp y en el que no están disponibles la amplia gama de epítopos de Tbp potenciales. Uno de los componentes de la subunidad Tbp del complejo Tbp A + B puede proceder de una primera cepa de *N. meningitidis* y el otro de una segunda cepa diferente de la primera. Por ejemplo, el dímero TbpA se toma de la primera cepa y el TPB de la segunda. Las proteínas TbpA y TbpB pueden seleccionarse independientemente de las cepas K454, H44/76 y B16B6. Las Tbp pueden aislarse directamente de la fuente bacteriana o pueden producirse por métodos recombinantes comúnmente conocidos en la técnica. También se consideran combinaciones de proteínas de otras cepas, y la combinación de componentes de otras cepas de bacterias ofrece el potencial de proporcionar a un individuo un amplio espectro de protección contra la infección meningocócica. Además es opcional que una composición de vacunas contenga una mezcla de proteínas A de diferentes cepas o una mezcla de proteínas B de diferentes cepas, ensanchando además el espectro potencial de protección. Incluso una opción más es que lo Tbp sean obtenidos o derivados de otras bacterias, incluyendo *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica* y *Moraxella catarrhalis*.

En la presente invención la expresión “proteína de fijación a transferrina” o “Tbp” se refiere a una proteína que bien sola se fija a la transferrina o bien puede ser parte de un complejo de proteínas que se fija a la transferrina. La expresión también abarca fragmentos, variantes y derivados de dicha proteína siempre que los anticuerpos, producidos contra el fragmento, variante o derivados se fijen a la proteína. Por tanto TbpA y TbpB tanto disociadas como asociadas en un complejo se considera que son Tbp. Además, los mutantes, las proteínas de fusión o los fragmentos de cualquier TbpA o B u otros derivados del complejo TbpA+B con una identidad antigénica común también se consideran representados por la expresión Tbp en la presente invención.

Una composición puede comprender un complejo de dos TbpA y una TbpB. Las proteínas se mantienen de este modo juntas en la relación vista en el receptor natural. Las proteínas naturales pueden estar unidas, por ejemplo, por enlaces de hidrógeno o enlaces covalentes. En el último caso, cada TbpA está unida covalentemente a la TbpB, bien directamente o bien indirectamente. En una realización preferida, el complejo de TbpA y TbpB adopta una configuración natural.

Un complejo natural TbpA+B puede aislarse y purificarse a partir de *N. meningitidis*. Alternativamente también se proporciona la síntesis de la proteína Tbp recombinante seguida por ensamblaje del complejo TbpA+B *in vitro*. El complejo TbpA+B puede formarse por mezclamiento, o puede reticularse por métodos físicos (por ej, radiación UV) o químicos conocidos en la técnica, dando como resultado una combinación de las Tbp que permanecerán unidas y no pueden disociarse unas de otras. En un ejemplo adicional, una proteína recombinante monocatenaria que comprende dos secuencias de TbpA, preferiblemente en la forma de un dímero de TbpA, se une luego covalentemente con la proteína TbpB para formar un complejo TbpA+B *in vitro*. Otro ejemplo proporciona que TbpA+B están mutados de modo que se introduzcan residuos de cisteína que faciliten la formación de puentes disulfuro entre las subunidades TbpA y TbpB, de modo que se obtiene un complejo covalente.

En la preparación de una proteína recombinante TbpA y TbpB los genes pueden también estar truncados de modo que se incorporan en el complejo Tbp solamente los dominios que se sabe contribuyen a la antigenicidad de la proteína.

En algunas composiciones el complejo TbpA+B es susceptible de actuar como receptor de transferrina y se fija a la transferrina humana. En otras composiciones de la invención el complejo TbpA+B es no funcional en el sentido de que no se fija a la transferrina, pero no obstante proporciona un componente antigénico que desencadena una respuesta inmune apropiada.

La invención proporciona una composición que comprende una Tbp y vesículas de la membrana exterior de *N. meningitidis*. Una ventaja de esta composición es que cuando se administra esta vacuna a un paciente presenta una

diferente combinación de antígenos de *N.meningitidis*, y particularmente antígenos que están en una conformación sustancialmente como están presentes en la membrana de organismos infestantes vivos. La combinación ofrece el potencial de una protección más eficaz contra la infección o un espectro de protección más amplio que las vacunas existentes. Los métodos conocidos de aislamiento de vesículas de membranas exteriores, tales como el tratamiento con desoxicolato son adecuados para la preparación de composiciones de la invención. En diversas realizaciones preferidas la proteína Tbp es TbpA, TbpB o TbA+B bien sea en un complejo natural o en una forma disociada.

Las vesículas de la membrana exterior pueden pretratarse adicionalmente *in vitro* con Tbp de modo que enriquezcan la membrana vesicular con Tbp. Por "enriquecer" y términos similares, se hace referencia a una vesícula de membrana exterior a la cual se ha añadido Tbp de modo que se aumenta la concentración o densidad de las proteínas TBP en la vesícula. Preferiblemente el enriquecimiento da como resultado una vesícula de membrana exterior que tiene un número mayor de receptores de transferrina localizados en la membrana, debido a una concentración aumentada de TbpA y TbpB después de su adición a la vesícula y su asociación en los receptores o estructuras similares a los receptores. Una ventaja particular de tales realizaciones de la invención es que los receptores Tbp, independientemente de sus componentes antigénicos claves de la vacuna, están presentes en un entorno altamente antigénico para mimetizar con precisión el entorno en el que están presentes los receptores de transferrina en bacterias infestantes vivas.

Como se ha mencionado previamente los componentes Tbp de la composición no necesitan ser Tbp de tipo silvestre. Pueden ser preparados recombinantemente, y al hacerlo así se pueden introducir alteraciones en las secuencias. En un ejemplo típico de la invención la TbpB recombinante se modifica para que contenga un dominio de fijación a membrana. Un dominio preferido que abarca la membrana es una región alfa helicoidal hidrófoba añadida a cualquiera de los extremos N o C de la proteína TbpB. Sin embargo, una región de anclaje de membrana no solamente necesita ser una hélice alfa, pues la adición de un ácido graso o cadena lipídica podría también facilitar el anclaje en la membrana. De hecho, se cree que la TbpB de tipo silvestre se ancla en la membrana exterior bacteriana mediante un ancla de cadena lipídica. En un ejemplo adicional de la invención en uso, las vesículas de la membrana exterior se tratan previamente *in vitro* con TbpB recombinante de fijación a membranas de modo que enriquezcan la membrana vesicular con TbpB. Las VME (vesículas de membrana exterior) enriquecidas con Tbp se generan adicionalmente induciendo altos niveles de expresión de Tbp en *N. meningitidis* y luego aislando las VME mediante uno de los métodos descritos previamente. El último método se consigue típicamente mediante transformación del hospedante *N. meningitidis* con un vector de expresión adecuado en el cual se ha insertado un gen o genes que codifican las Tbp elegidas. Los vectores de expresión adecuados para uso en especies de *Neisseria* incluyen el plásmido pMGC10 (Nassif *et al.* (1991)).

Se prefiere que la composición de la presente invención comprenda vesículas de membrana exterior y complejos TbpA+B aislados de una gama de diferentes cepas de *N. meningitidis*. Otras composiciones preferidas de la invención comprenden otras proteínas de *N. meningitidis* incluyendo antígenos de superficie, proteínas periplásmicas, superóxido-dismutasa y glicoproteínas.

La composición de otro aspecto de la invención puede comprender, en lugar de o además de, vesículas de membrana exterior, uno o más liposomas, incluyendo cada liposoma TbpA y/o TbpB, incluyendo preferiblemente TbpA y TbpB asociados en un receptor o en un complejo similar al receptor. De este modo se proporciona un medio adicional de presentar los antígenos del receptor de transferrina.

En una realización adicional de la invención, la composición comprende el antígeno de 22kD (proteína de superficie de *Neisseria* (NspA)) así como vesículas de membrana exterior. La NspA y su preparación están descrita por Martin *et al.* 1997.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una vacuna que comprende una composición de la invención tal y como se ha descrito antes. Una vacuna de la invención puede también comprender también anticuerpos para Tbp y por tanto proporcionar un nivel de inmunidad pasiva para la infección bacteriana.

Otro aspecto más de la invención proporciona un método de obtener una composición que comprende combinar TbpA, TbpB y vesículas de la membrana exterior de *N. meningitidis* con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se prefiere que la relación molar de Tbp a TbpB sea aproximadamente 2:1. Las vesículas de membrana exterior pueden ser tratadas previamente *in vitro* con TbpA+B naturales para enriquecer la membrana vesicular con el complejo Tbp. Sin embargo, las vesículas de la membrana exterior pueden pretratarse con otros componentes proteínicos de modo que se enriquezcan también con estos componentes antigénicos. Las vesículas de la membrana exterior pueden pretratarse también con proteínas antigénicas y proteoglicanos de varias cepas diferentes de *N. meningitidis*.

Incluso otro aspecto más de la invención proporciona una composición que comprende TBP y vesículas de membrana exterior, en la que las vesículas de membrana exterior son de diferentes cepas de *N. meningitidis*.

Un aspecto adicional proporciona el uso de Tbp A y B en la preparación de un medicamento para vacunación humana. Se prefiere que tal medicamento sea adecuado para vacunación contra infección meningocócica, aunque algunas composiciones de la invención proporcionan protección de amplio espectro para la infección por una gama más amplia de agentes bacterianos patógenos.

Las realizaciones de la invención se estudian con más detalle por medio del Ejemplo que se describe a continuación. Los resultados del Ejemplo se ilustran por los dibujos que se acompañan, en los que:

La figura 1 muestra la inmunización de ratones con TbpA+B y vesículas de membrana exterior;

La figura 2 muestra la inmunización de ratones con TbpA+B;

La Figura 3 muestra la protección de ratones contra la infección Ip después de la inmunización con TbpA+B, TbpA aislado o TbpB aislado;

Las Figuras 4A y 4B muestran la protección de ratones contra la infección meningocócica tras la inmunización bien sea con TbpA+B, TbpA o TbpA (nTbp) precedente de Neisseria o diversas Tbp recombinantes (rTbp);

Las Figuras 5A y 5B muestran la protección de ratones contra inoculaciones de 10^6 a 10^7 organismos/ratón de la cepa K454 de *N. meningitidis* respectivamente, tras la inmunización con TbpA+B, TbpB o TbpA recombinantes;

La Figura 6 muestra la protección contra la inoculación con un serogrupo heterólogo; y

La Figura 7 muestra la protección contra la inoculación con B16B6.

Ejemplo

Datos de protección de ratones

Se inmunizaron ratones (CAMR-NIH) con Tbp y/o vesículas de membrana exterior y se inocularon con una cepa meningocócica homóloga o heteróloga. Los supervivientes por grupo de ratones inmunizados con la vacuna de Tbp de la cepa K454 y vesículas de membrana exterior tras la inoculación por la cepa K454 se muestran en la Figura 1. Comparada con las Tbp, la vacuna de vesículas de membrana exterior confirió una protección reducida, pero esto puede deberse a que se produjo de una cepa diferente del grupo B (H44/76). Los animales inmunizados con TbpA+B aisladas de la cepa K454 también fueron protegidos contra la inoculación con otros organismos del serogrupo B (Fig. 1), viéndose la mayor protección con la cepa homóloga y cepas que expresan una TbpB con un peso molecular similar. Se observó escasa protección o ninguna contra la inoculación de meningococos que poseen TbpB con un peso molecular muy diferente (cepa B16B6). Con cepas de inoculación heterólogas hay un número ligeramente mayor de supervivientes en los grupos vacunados con la combinación de Tbp + vesículas de membrana exterior. Sin embargo, los números implicados son pequeños y no pueden extraerse conclusiones definitivas. Es interesante observar que los ratones inmunizados con TbpA+B de la cepa K454 también fueron protegidos contra la infección con un serogrupo C pero no con la cepa del serogrupo A (Fig. 2).

La protección contra la inoculación con la cepa K454 con ratones inmunizados con TbpA+B co-purificadas y TbpA y TbpB aisladas se muestra en la Figura 3. Puede verse que la TbpB es el antígeno predominante responsable de la protección, con una escasa protección proporcionada por TbpA sola.

TbA y TbpB recombinantes

Las TbpA y TbpB procedentes de la cepa K454 de *N. meningitidis* se clonaron y sobreexpresaron en *E. coli*. Las proteínas se purificaron usando cromatografía de afinidad y se usaron para determinar su potencia protectora en un modelo de ratón con enfermedad meningocócica. Las Tbp recombinantes mostraron una protección equivalente a la proporcionada por las Tbp aisladas de *N. meningitidis* estresadas con hierro (Figuras 4A y 4B). Estas Tbp recombinantes también se utilizaron en dos experimentos adicionales mayores de inoculación intraperitoneal (Figuras 5A-B).

La fuerte y consistente potencia protectora de las Tbp contra la infección intraperitoneal en ratón con *N. meningitidis* es probablemente la evidencia más fuerte para su potencial como vacuna.

Es muy interesante que los resultados mostrados en las Figuras 4A y 5 A-B, aunque proceden de experimentos de diseño similar, muestran la sorprendente variabilidad asociada a las composiciones de vacuna que dependen solamente de TbpA o TbpB solas. En la figura 4B la composición de TbpA recombinante presentó bajos niveles de protección comparada con TbpB o TbpA+B. Sin embargo, en las Figuras 5A y 5B la composición de vacuna de TbpA recombinante que mostró altos niveles de protección comparables a los del complejo TbpA+B y de la composición de TbpB sola demostraron una mala protección frente a la infección. Este último resultado es completamente contrario a las enseñanzas de la técnica anterior.

Respuesta inmune humana a TbpA y TbpB en sueros convalescentes

Los autores de la presente invención emprendieron una serie de estudios en relación con la respuesta de anticuerpos en seres humanos a TbpA y TbpB después de la enfermedad meningocócica. Las conclusiones generales son que tanto TbpA como TbpB se expresan durante la enfermedad meningocócica y que y de nuevo se produce contra ellos una respuesta inmune. La respuesta es funcional (opsónica) y es de una reacción cruzada más reactiva entre diferentes

cepas meningocócicas que en la respuesta inducida por inmunización de animales con las Tbp. La respuesta inmune a TbpA parece ser más fuerte y de reacción cruzada más reactiva que la correspondiente a TbpB, confirmando la importancia del potencial de vacuna de TbpA.

5 *TbpA y TbpB forman un receptor de transferrina*

Los estudios estructurales de los inventores indican que el receptor de transferrina situado en la superficie meningocócica consiste en dos moléculas de TbpA y una molécula de TbpB que actúan conjuntamente.

10 *Efecto de una vacuna que contiene las Tbp A+B*

Se llevaron a cabo ensayos adicionales de eficacia de formulaciones de vacuna de la TbpB recombinante frente a la Tbp A+B recombinante contra la inoculación de las cepas de *N. meningitidis* L91705 y B16B6, cuyos resultados se ilustran en las figuras 6 y 7 respectivamente. En ambos casos se confirió algo de protección mejorada por A + B en comparación con B sola.

Referencias

- 20 **Ala'Aldeen J.** (1996) *Med. Microbiol* vol 44, pp. 237-243.
- Boulton et al.** (1988) *Biochem. J.* vol. 334, pp. 269-273.
- Ferreirós et al.** (1998) *Rev. in Med. Microbiol.* Vol. 9, N° 1., pp. 29-37.
- 25 **Gorringe et al.** (1996) 10th *Pathogenic Neisseria Conference*, poster 46 abstract.
- Martin et al.** (1967) *J. Exp. Med.* vol. 185, n° 7, pp. 1173-1181
- Nassif et al.** (1991) *J. Bacteriol*, vol. 173 n° 7, pp. 2147-54.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende vesículas de la membrana exterior de *N. meningitidis* enriquecidas con una proteína de fijación a transferrina (Tbp).

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la Tbp comprende TbpA, TbpB, o TbpA y TbpB.

3. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en la que las vesículas de la membrana exterior están enriquecidas con Tbp de diferentes cepas de *N. meningitidis*.

4. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que las Tbp están hechas recombinantemente.

5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que las vesículas de la membrana exterior están enriquecidas con proteínas de *N. meningitidis* distintas de Tbp.

6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que las vesículas de la membrana exterior son de diferentes cepas de *N. meningitidis*.

7. Una vacuna que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. Un método para preparar una composición, que comprende añadir una Tbp a una vesícula de membrana exterior de *N. meningitidis* de modo que se aumente la concentración o densidad de las Tbp en esa vesícula.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la Tbp comprende TbpA, TbpB, o TbpA y TbpB.

10. Un método para enriquecer una vesícula de membrana exterior con una Tbp, que comprende inducir altos niveles de expresión de Tbp en *N. meningitidis* y aislar de la misma una vesícula de membrana exterior.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende transformar la *N. meningitidis* con un vector de expresión en el que se ha insertado un gen o genes que codifican la Tbp.

12. Uso de vesículas de la membrana exterior de *N. meningitidis* enriquecidas con una Tbp en la preparación de un medicamento para vacunación contra la enfermedad meningocócica.

13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la Tbp comprende TbpA, TbpB, o TbpA y TbpB.

14. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la preparación de un medicamento para vacunación contra la enfermedad meningocócica.



FIG. 2

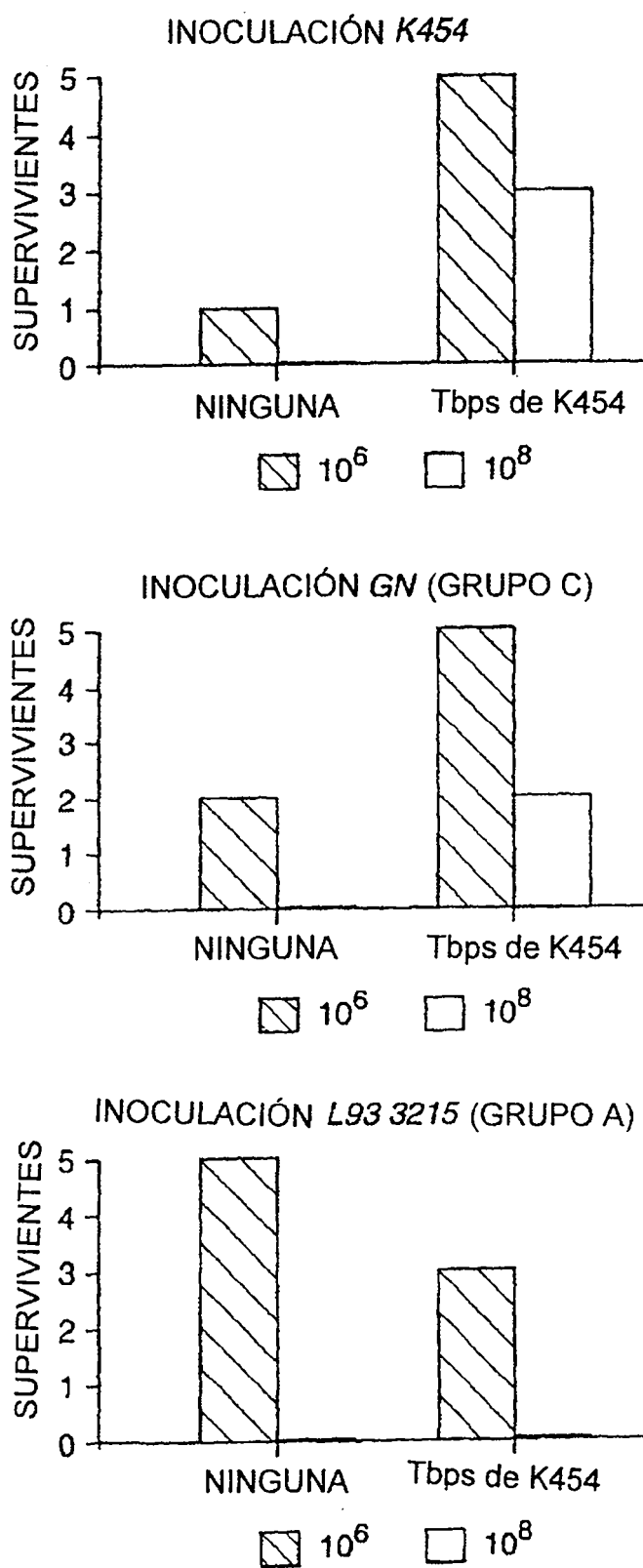
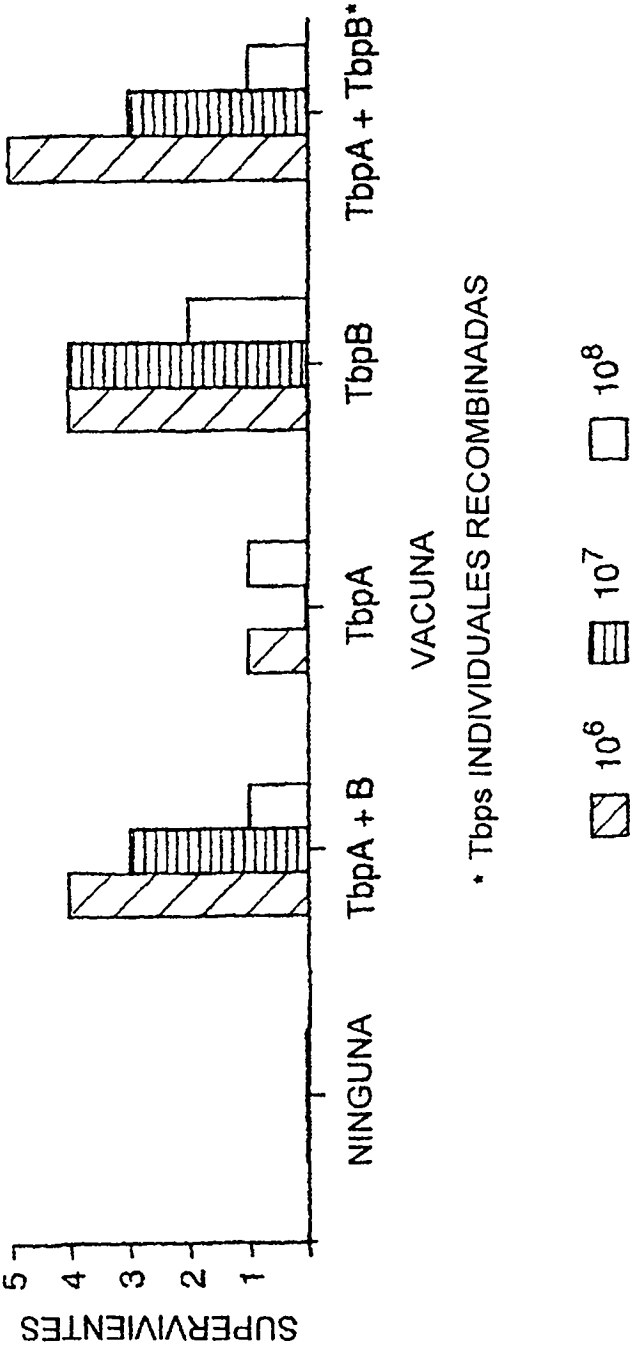


FIG. 3



* Tbps INDIVIDUALES RECOMBINADAS

FIG. 4A

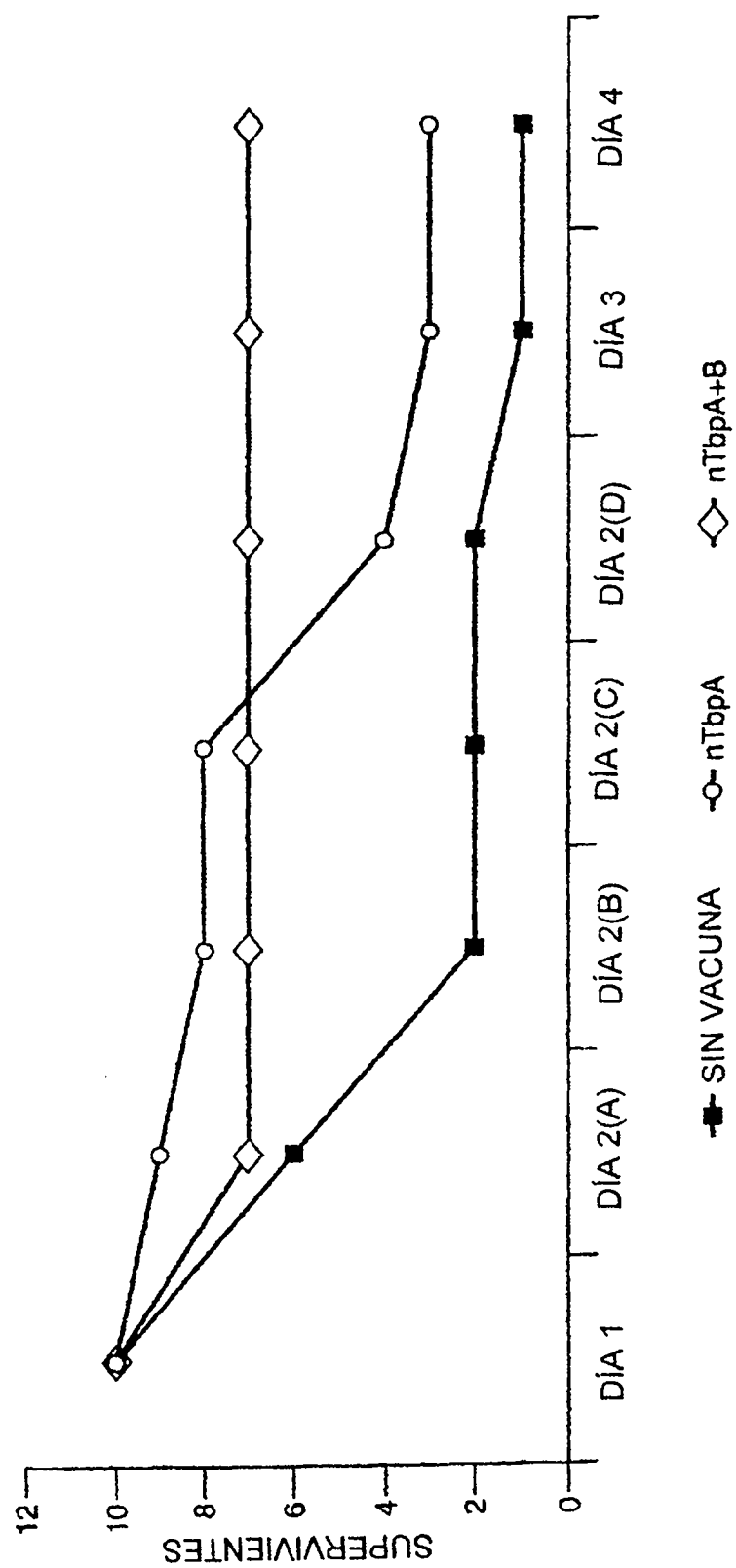


FIG. 4B

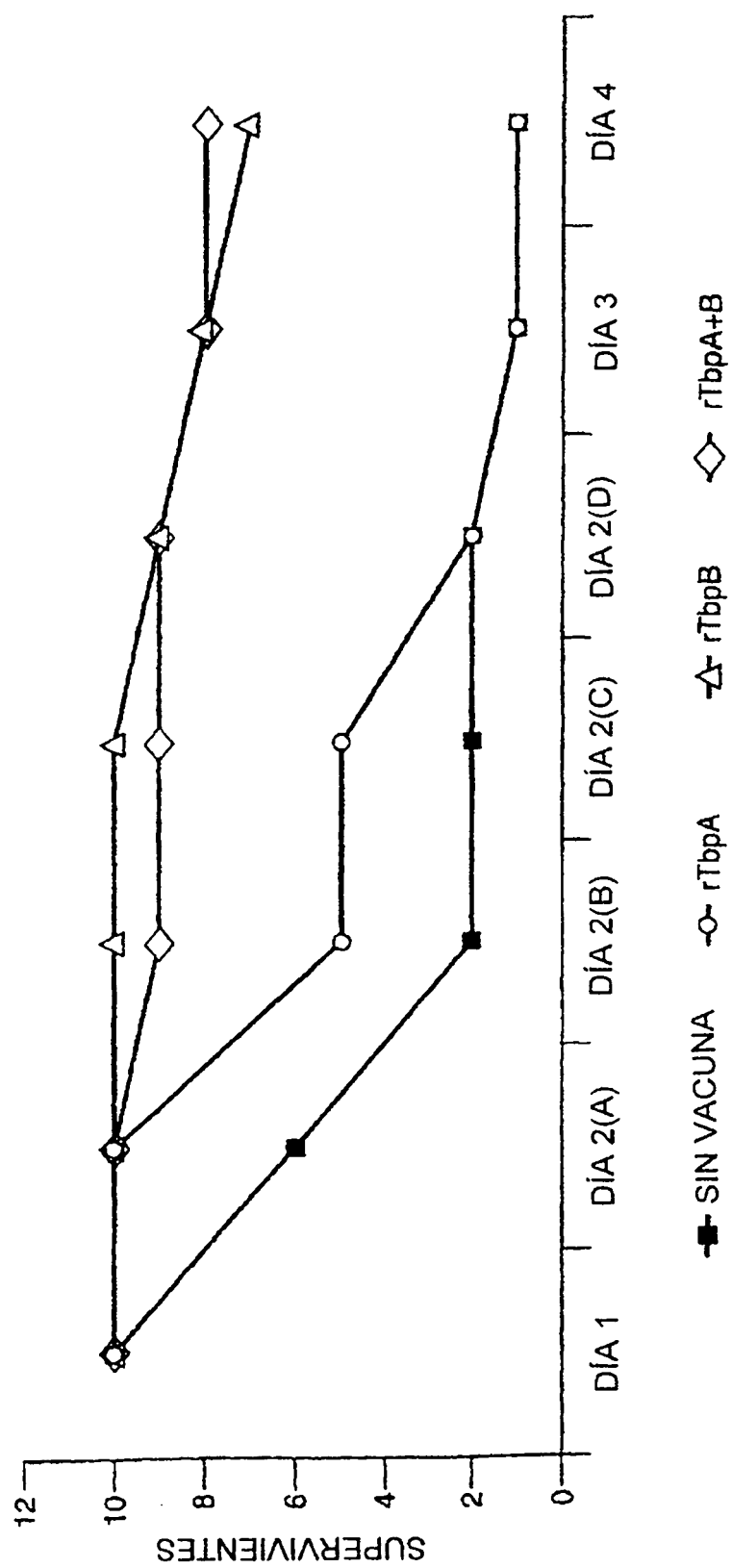


FIG. 5A

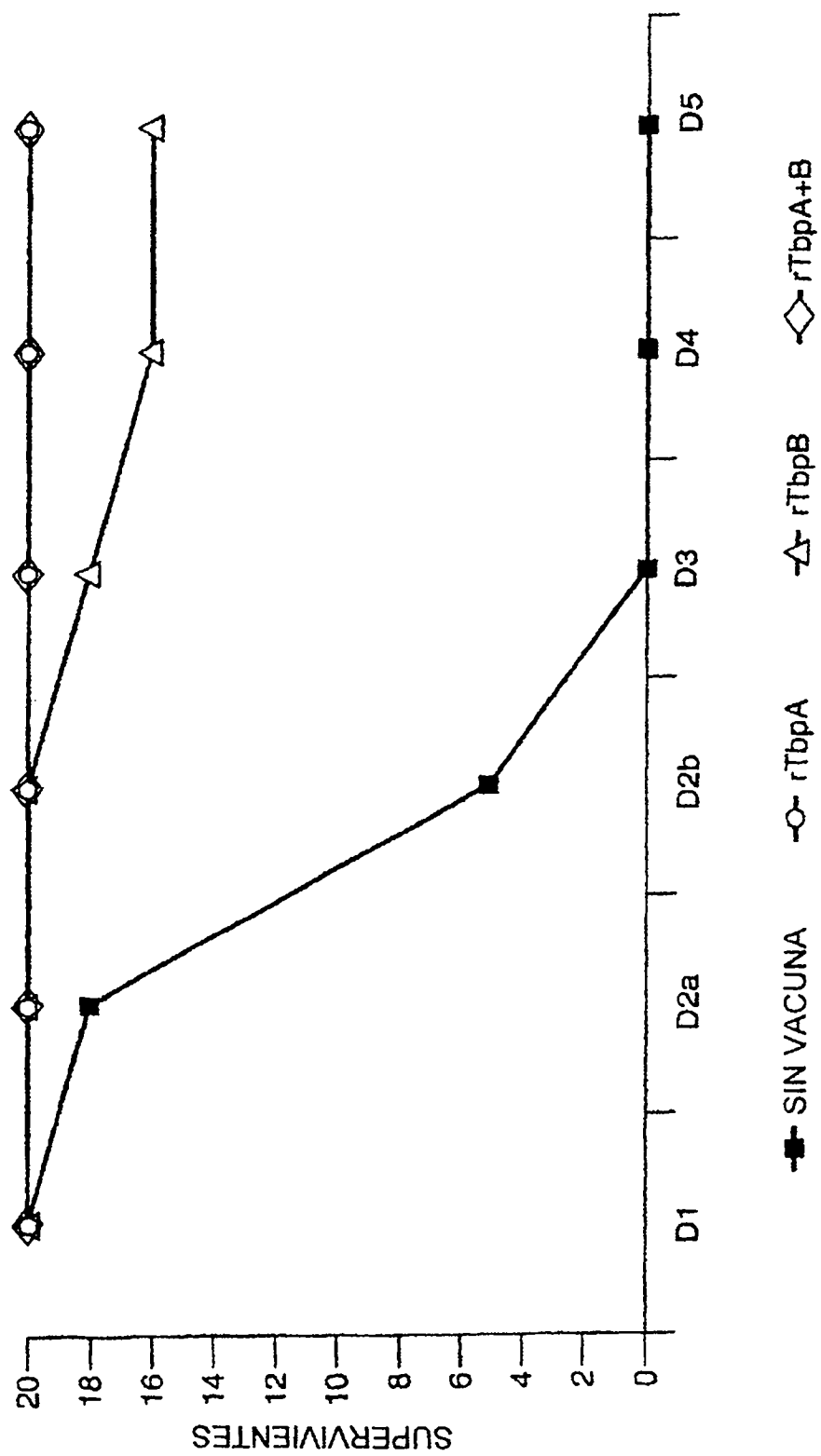


FIG. 5B

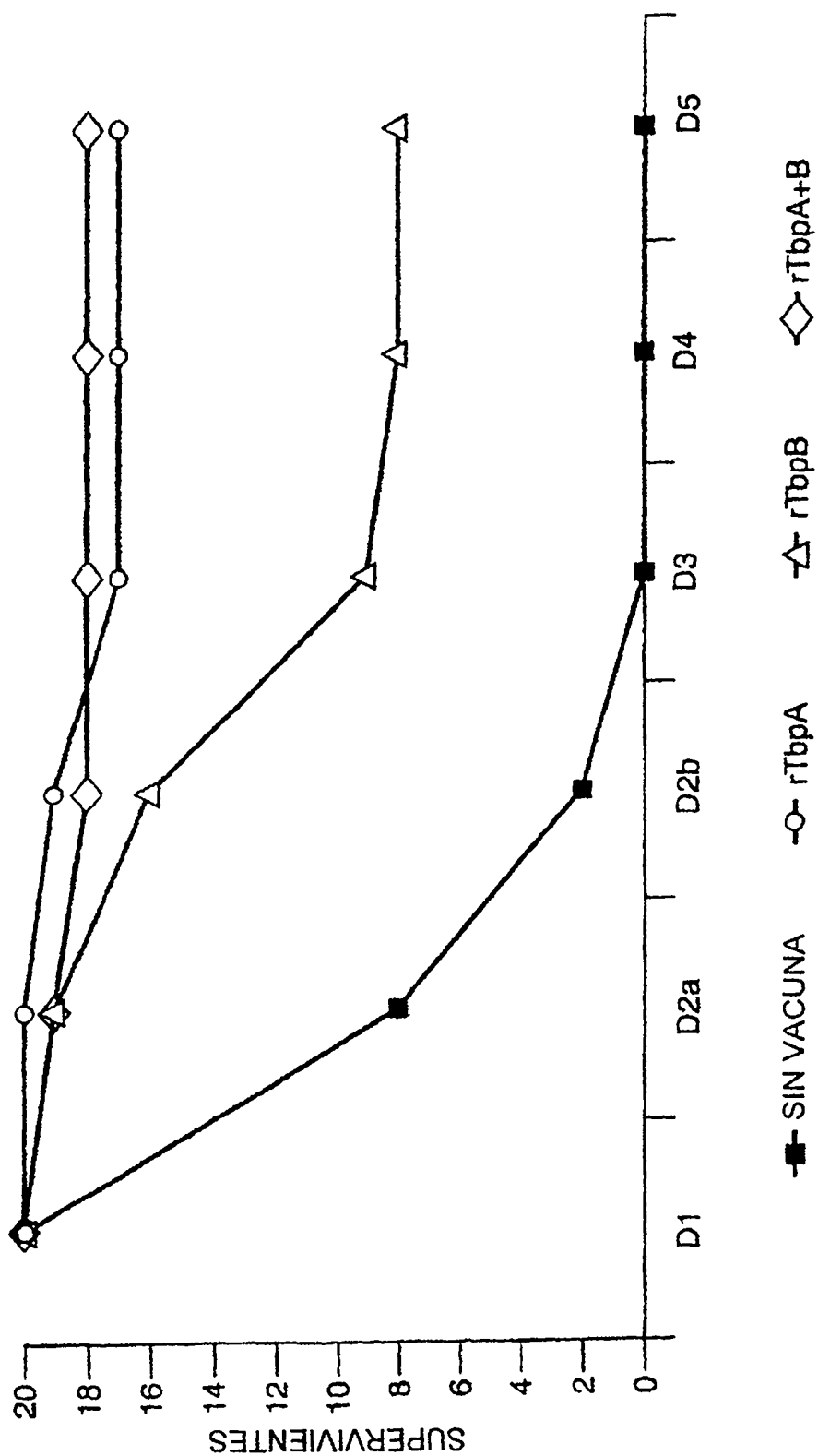


FIG. 6

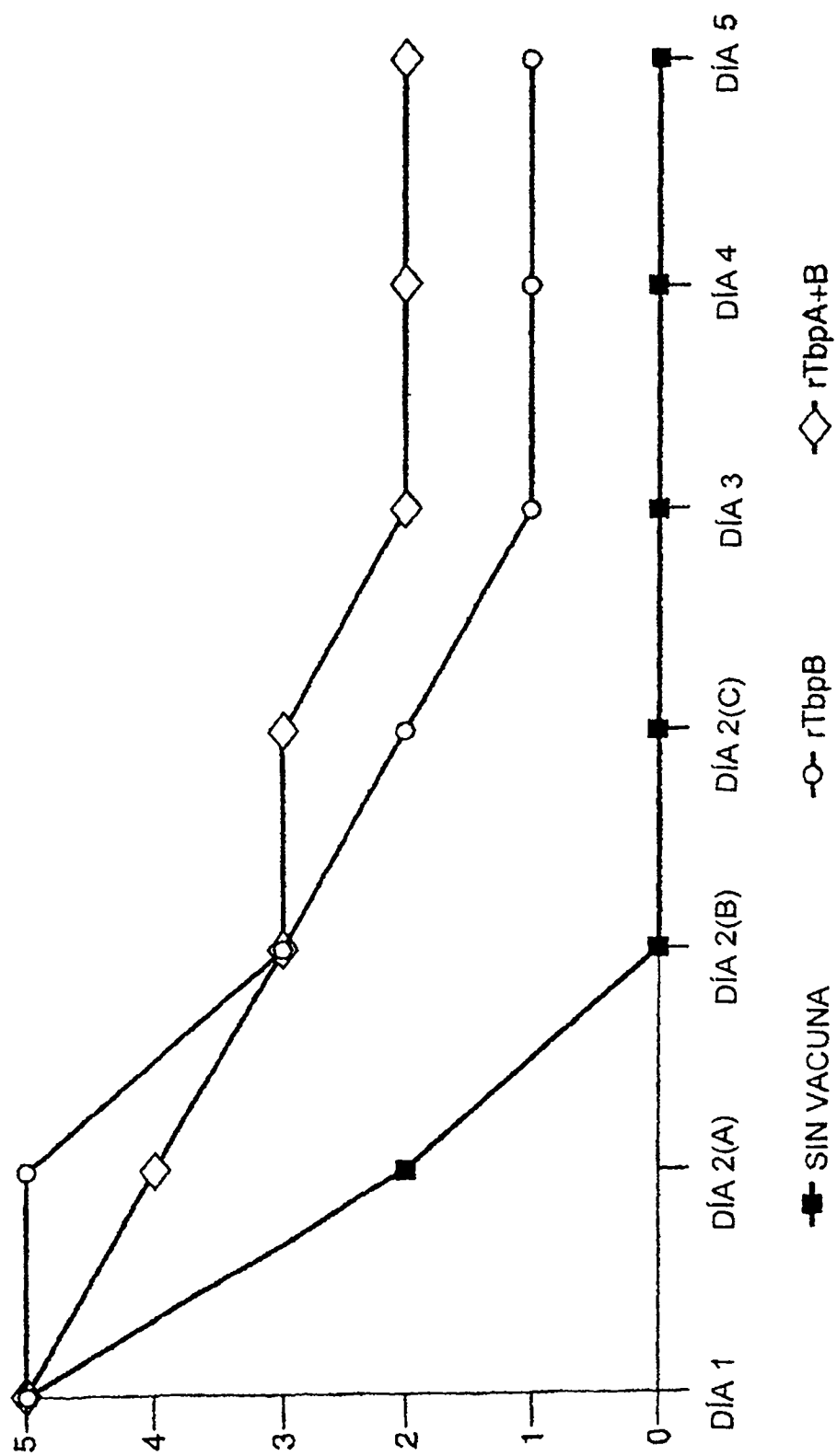


FIG. 7

