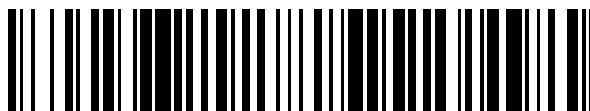


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 080**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2004 E 09075550 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2172213**

54 Título: **Vacunas inyectables contra múltiples serogrupos de meningococos**

30 Prioridad:

30.01.2003 GB 0302217

02.10.2003 GB 0323101

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.07.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

COSTANTINO, PAOLO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 411 080 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

Vacunas inyectables contra múltiples serogrupos de meningococos

5 CAMPO TECNICO

La presente invención pertenece al campo de las vacunas, particularmente frente a la meningitis bacteriana.

10 TECNICA ANTECEDENTE

Neisseria meningitidis es un patógeno humano gramnegativo [1] que provoca meningitis bacteriana. Está estrechamente emparentado con *N. gonorrhoeae*, auNOue una característica que diferencia claramente a los meningococos es la presencia de una capsula de polisacáridos que está presente en todos los meningococos patógenos.

Basándonos en el polisacárido capsular de los organismos, se han identificado doce serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y & Z). El serogrupo A ('MenA') es la causa más habitual de enfermedades epidémicas en el África subsahariana. Los serogrupos B & C son responsables de la mayoría de los casos en los países desarrollados, mientras que los casos restantes están causados por los serogrupos W135 & Y.

Al igual que se usa para la clasificación, los polisacáridos capsulares se han utilizado para la vacunación. Durante muchos años se ha conocido una vacuna tetravalente inyectable de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y & W135 [2,3] y está autorizada para su uso en seres humanos. AuNOue es eficaz en adolescentes y adultos, induce una respuesta inmunitaria pobre y de corta duración y protección, y no puede usarse en niños [por ejemplo,4]. Los polisacáridos de esta vacuna no están conjugados y están presentes en una proporción ponderal de 1:1:1:1 [5]. Mencevax ACWYTM y MenomuneTM contienen ambos 50 µg de cada polisacárido purificado una vez reconstituídos a partir de sus formas liofilizadas. Los sacáridos de la capsula de los serogrupos A, C, W135 & Y también se han combinado en forma de conjugados [6-9] para dar vacunas tetravalentes, por ejemplo, el producto no coadyuvado MenactraTM.

Los oligosacáridos conjugados del serogrupo C se han aprobado para su uso en seres humanos, incluyendo MenjugateTM [10,11], MeningitecTM y NeisVac-CTM. Los productos MenjugateTM y MeniNOitecTM tienen antígenos de 25 oligosacáridos conjugados con un portador CRM197, mientras que NeisVac-CTM usa el polisacárido completo (des-O-acetilado) conjugado con un portador toxoide tetánico,

Permanece sin embargo, la necesidad de mejoras en las vacunas conjugadas frente a los serogrupos A, W 135 e Y, y en su elaboración. Esa necesidad es abordada por los productos, procesos y usos desvelados en la referencia 7, pero aun queda ámbito para modificaciones y mejoras adicionales.

40 DIVULGACION DE LA INVENCION

La invención se refiere a una composición inmunógena inyectable que comprende sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W135 e Y de la *N.meningitidis*, en donde los mencionados sacáridos capsulares están conjugados con proteína(s) portadora(s) y/o son oligosacáridos, y en donde la composición comprende ≤50 µg de sacáridos meningococos por dosis. Esta invención proporciona específicamente la composición inmunógena inyectable de la reivindicación 1.

La invención también proporciona dicha composición inmunógena inyectable, en la que la composición comprende adicionalmente un antígeno de uno o más de: (a) serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo B; y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*.

Los antígenos incluidos en ocho composiciones preferidas de la invención son: (1) serogrupos A, C, W135 & Y de *N. meningitidis*; (2) serogrupos A, B, C, W135 & Y de *N. meningitidis*; *H. influenzae* de tipo B y serogrupos A, C, W135 & Y de *N. meningitidis*; *H. influenzae* de tipo B y serogrupos A, B, C W135 & Y de *N. meningitidis*; *S. pneumoniae* y serogrupos A, C, W135 & Y de *N. meningitidis*; *S. pneumoniae* y serogrupos A, B, C, W135 & Y de *N. meningitidis*; *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y serogrupos A, C, W135 & Y de *N. meningitidis* *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y serogrupos A, B, C, W135 & Y de *N. meningitidis*.

Los antígenos de sacáridos de las composiciones de la invención son preferiblemente oligosacáridos. Los antígenos de sacáridos de las composiciones de la invención son muy preferiblemente oligosacáridos conjugados.

Mezclas de sacáridos de meningococos

Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. Se prefiere que la eficacia protectora de los antígenos sacáridos individuales no se elimine mediante su combinación, auNOue puede reducirse la inmunogenicidad real (por ejemplo, los títulos de ELISA).

La proporción (p/p) de sacárido MenA: sacárido MenC puede ser mayor de 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o más alta).

5 La proporción (p/p) de sacárido MenY: sacárido MenW135 puede ser mayor de 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o más alta) y/o la proporción de sacárido MenY: sacárido MenC puede ser menor de 1 (por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o más baja).

10 Una cantidad típica de cada antígeno de sacáridos de meningococo por dosis está entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo, alrededor de 1 µg, alrededor de 2,5 µg, alrededor de 4 µg, alrededor de 5 µg, o alrededor de 10 µg (expresado como sacárido).

15 Las proporciones preferidas (p/p) para sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1. Las proporciones preferidas (p/p) para sacáridos de los serogrupos C:W135:Y son: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1; and 2:1:1. Se prefiere usar una masa sustancialmente igual de cada sacárido.

Purificación de los polisacáridos capsulares

20 Los polisacáridos capsulares de los meningococos se preparan típicamente mediante un proceso que comprende las etapas de precipitación del polisacárido (por ejemplo, usando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción fría con fenol (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar el LPS) [por ejemplo ref. 15].

25 Un proceso más preferido [7], implica sin embargo la precipitación del polisacárido seguido de una solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior. La precipitación puede conseguirse usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro), o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Particularmente se prefiere el bromuro de cetiltrimetilamonio (*Cetyltrimethylammonium bromide*, 'CTAB') [16]. La solubilización del material precipitado puede
30 conseguirse usando un alcohol inferior tal como metanol, propan-t-ol, propan-z-ol, butan-t-ol, butan-z-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilpropan-z-ol, dioles, etc., pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar complejos de CTAB-polisacárido. El etanol se añade preferiblemente al polisacárido precipitado para dar una concentración final de etanol (basada en el contenido total de etanol y agua) de entre el 50% y el 95%.

35 Después de la resolubilización, el polisacárido puede tratarse adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que no es aceptable siquiera una contaminación menor (por ejemplo, para la producción de vacunas humanas). Esto implicará típicamente una o más etapas de filtración, por ejemplo, puede usarse filtración profunda, filtración a través de carbón activo, filtración por tamaños y/o
40 ultrafiltración.

Una vez filtrado para eliminar contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para un tratamiento y/o procesado adicionales. Esto puede conseguirse convenientemente mediante el intercambio de cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

45 Como alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares de la presente invención pueden obtenerse mediante una síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se desvela en la ref. 17, y la síntesis de MenA en la ref. 18.

50 El polisacárido puede modificarse químicamente. Por ejemplo, puede modificarse para sustituir uno o más grupos hidroxilo por grupos bloqueantes. Esto es particularmente útil para reducir la hidrólisis del serogrupo A [19] (véase a continuación). También puede realizarse una des-O-acetilación de los sacáridos,

Serogrupo B de *N. meningitidis*

55 Algunas composiciones de la invención incluyen un antígeno del serogrupo B de *N. meningitidis*. Al contrario que los serogrupos A, C, W135 e Y, el sacárido capsular de MenB no es adecuado para su uso como inmunógeno en seres humanos debido a su similitud con los antígenos propios. Si se va a usar un antígeno de sacárido de MenB, es necesario por lo tanto usar un sacárido modificado, tal como aquel en el que los grupos N-acetilo de los residuos de ácido siálico del sacárido se han sustituido por grupos N-acilo. Los grupos N-acilo
60 adecuados son grupos acilo de C₁ a C₈, tales como N-propionilo [20]. En lugar de usar un antígeno de sacárido, se prefiere usar sin embargo un antígeno de polipéptido.

Por lo tanto, la composición puede incluir uno o más antígenos de polipéptidos que inducen una respuesta inmunitaria que protege frente a la infección por MenB y/o que es bactericida frente a MenB. De forma más general,
65 la composición puede inducir preferiblemente, tras su administración a un sujeto, una respuesta de anticuerpos en

ese sujeto que es bactericida frente a dos o más (por ejemplo, 2 ó 3) de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 Y el linaje 3 del serogrupo B de *N. meningitidis*.

Se ha publicado la secuencia del genoma de la cepa MC58 de MenB [21] Y los antígenos adecuados pueden elegirse de entre los polipéptidos codificados [22]. Los antígenos preferidos se desvelan en las referencias 22 a 32. En lugar de consistir en un único antígeno, se prefiere que la composición de la invención comprenda una mezcla de 100 menos (por ejemplo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados, y particularmente se prefiere que la composición no incluya mezclas complejas o indefinidas de antígenos, por ejemplo, se prefiere no incluir vesículas de la 10 membrana exterior (*outer membrane vesicles*, OMV) en la composición.

Las composiciones preferidas incluyen uno o más de los siguientes cinco antígenos [32]: (1) una proteína 'NadA', preferiblemente en forma oligomérica (por ejemplo, en forma trimérica); (2) una proteína '741'; (3) una proteína '936'; (4) una proteína a '953'; y (5) una proteína '287'.

Los antígenos preferidos de MenB comprenden una secuencia de aminoácidos encontrada en una de las cepas son 2996, MC58, 95N477 Y 394/98. La proteína 287 es preferiblemente de la cepa 2996 o, mas preferiblemente, de la cepa 394/98. La proteína 741 es preferiblemente de las cepas del serogrupo B MC58, 2996, 394/98 95N477, o de la cepa 90/18311 del serogrupo C. Es más preferida la cepa MC58. Las proteínas 936, 953 Y NadA son preferiblemente de la cepa 2996. Cuando una composición incluye un antígeno de proteína en particular (por ejemplo, 741 6287), la composición puede incluir ese antígeno en más de una forma variante, por ejemplo, la misma 20 proteína, pero de más de una cepa. Estas proteínas pueden incluirse en tándem o como proteínas separadas.

La 'NadA' (adhesina A de *Neisseria*) de MenB se desvela como la proteína '961' en la referencia 25 (ID. SEC. 2943 & 2944) y como 'NMB1994' en la referencia 21 (véanse también los números de acceso del GenBank: 11352904 & 7227256). Puede encontrarse un estudio detallado de la proteína en la referencia 33. Cuando se usa según la presente invención, la NadA puede tomar varias formas. Las formas preferidas de NadA son variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, se prefiere la NadA sin su anclaje de membrana C-terminal (por ejemplo, delección de los residuos 351-405 para la cepa 2996, para dar la ID. SEC. NO: 1 de este documento), que a menudo se distingue en este documento por el uso de un superíndice 'C', por ejemplo, NadA(C). La expresión de NadA sin su dominio de anclaje a la membrana en *E. coli* da como resultado la secreción de la proteína en el sobrenadante del cultivo con la eliminación concomitante de su péptido líder 23mer (por ejemplo, para dejar un 327mer para la cepa 2996 [ID. SEC. NO: 2 de este documento]). Los polipéptidos sin sus péptidos líder se distinguen a veces en este documento mediante el uso de un 'NL', por ejemplo, NadA(NL) o NadA(C)(NL).

Los polipéptidos preferidos de NadA tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene una identidad del 50% o más (por ejemplo, del 60%, del 70%, del 80%, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID SEC. NO: 2; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. NO: 1, en la que n es 7 ó más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos para (b) carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) en el C-terminal y/o el N-terminal de la ID. SEC. NO: 1 (por ejemplo, NadA(C), NadA(NL), NadA(C)(NL)). Otros fragmentos preferidos comprenden un epítipo de la ID. SEC. 1, y un fragmento particularmente preferido de la ID. SEC. 1 es la ID. SEC. 2. Estas diversas secuencias incluyen variantes de la NadA (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Varias secuencias de la NadA se muestran en la Figura 9 de la referencia 34.

La proteína '741' de MenB se desvela en la referencia 25 (ID. SEC. 2535 & 2536) y como 'NMB1870' en la referencia 21 (véase también el número de acceso del GenBank: GI:7227128). La correspondiente proteína del serogrupo A [35] tiene el número de acceso del GenBank 7379322. La 741 es de forma natural una lipoproteína. Cuando se usa según la presente invención, la proteína 741 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de la 741 son variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, el N-terminal de la 741 puede estar delecionado hasta, e incluyendo, su secuencia de poliglicina (es decir, delección de los residuos 1 a 72 para la cepa MC58 [ID. SEC. NO: 3 de este documento]), que a veces se distingue en este documento mediante el uso de un prefijo 'AG'. Esta delección puede mejorar la expresión. La delección también elimina el sitio de lipidación 741. Las secuencias de 741 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o más (por ejemplo, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. NO: 3. Las secuencias preferidas de la 741 comprenden un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. NO: 3, donde n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 741. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más 55 aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) sin el C-terminal y/o el N-terminal de la ID. SEC. NO: 3. Estas secuencias incluyen variantes de la 741 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Varias secuencias de la 741 pueden encontrarse en las ID. SEC. 1 a 22 de la referencia 31, en las ID. SEC. 1 a 23 de la referencia 36, y en las ID. SEC. 1-299 de la referencia 37.

La proteína 741 es un antígeno extremadamente eficaz para desencadenar respuestas de anticuerpos anti-

meningocócicos, y se expresa en todos los serogrupos de meningococos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos, y que uno de estos se divide de nuevo para dar tres variantes en total [38], y aunque el suero creado frente a una variante usada es bactericida en el mismo grupo de variantes, no es activo frente a cepas que expresan una de las otras dos variantes, es decir, hay una protección cruzada intra-variantes, pero no una protección cruzada inter-variantes [36,38]. Para una eficacia máxima en cepas cruzadas, por lo tanto, se prefiere que una composición incluya más de una variante de la proteína 741. Un ejemplo de secuencia de cada variante se da en las ID. SEC. N°s: 10, 11 Y 12 en este documento, partiendo de un residuo de cisteína N-terminal al que se unirá covalentemente un lípido en la forma natural de la lipoproteína. Por lo tanto se prefiere que la composición incluya al menos dos de: (1) una primera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el a% con la ID. SEC. NO: 10 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la ID. SEC. NO: 10; (2) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el b% con la ID. SEC. NO: 11 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la ID. SEC. NO: 11; Y (3) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el c% con la ID. SEC. NO: 12 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la ID. SEC. NO: 12. El valor de a es de 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 de 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 de 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. El valor de x es de 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 de 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 de 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). Los valores de x, y y z no están intrínsecamente relacionados entre sí. Se prefiere que cualquier secuencia dada de aminoácidos de 741 no esté en más de una de las categorías (1), (2) Y (3). Cualquier secuencia dada de 741 estará únicamente en una de las categorías (1), (2) Y (3). Por lo tanto se prefiere que: la proteína (1) tenga menos de un i% de identidad de secuencia con la proteína (2); la proteína (1) tenga menos de un j% de identidad de secuencia con la proteína (3); y la proteína (2) tenga menos de un k% de identidad de secuencia con la proteína (3). El valor de i es de 60 o más (por ejemplo, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.), y es como mucho de a. El valor de j es de 60 o más (por ejemplo, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.), y es como mucho de b. El valor de k es de 60 o más (por ejemplo, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.), y es como mucho de c. Los valores de t, j y k no están intrínsecamente relacionados entre sí.

La proteína '936' del serogrupo B se desvela en la referencia 25 (ID. SEC. 2883 & 2884) y como 'NMB2091' en la referencia 21 (véase también el número de acceso del GenBank GI:7227353). El correspondiente gen del serogrupo A [35] tiene el número de acceso del GenBank 7379093. Cuando se usa según la presente invención, la proteína 936 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de la 936 son variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, puede deleccionarse el péptido Líder N-terminal de 936 (por ejemplo, delección de los residuos 1 a 23 para la cepa MC58, para dar 936(L) [ID. SEC. NO: 4 de este documento]). Las secuencias de 936 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o más (por ejemplo, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. NO: 4. Las secuencias preferidas de 936 comprenden un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. NO: 4, donde n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 936. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1,2,3,4,5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del C-terminal y/o del N-terminal de la ID. SEC. NO: 4. Estas secuencias incluyen variantes de la 936 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.).

La proteína '953' del serogrupo B se desvela en la referencia 25 (ID. SEC. 2917 & 2918) y como 'NMB1030' en la referencia 21 (véase también el número de acceso del GenBank GI:7226269). La correspondiente proteína del serogrupo A [35] tiene el número de acceso del GenBank 7380108. Cuando se usa según la presente invención, la proteína 953 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de la 953 son variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, el peptide Líder N-terminal de la 953 puede estar deleccionado (por ejemplo, delección de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58, para dar 953(NL) [ID. SEC. NO: 5 de este documento]). Las secuencias de 953 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o más (por ejemplo, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. NO: 5. Las secuencias preferidas de 953 comprenden un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. NO: 5, donde n es 7 o más (en la que n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 953. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del C-terminal y/o del N-terminal de la ID. SEC. NO: 5. Estas secuencias incluyen variantes de la 936 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Las formas alélicas de la 953 pueden observarse en la Figura 19 de la referencia 28.

La proteína '287' del serogrupo B se desvela en la referencia 25 (ID. SEC. 3103 & 3104), como 'NMB2132' en la referencia 21, y como 'GNA2132' en la referencia 22 (véase también el número de acceso del GenBank GI:7227388). La correspondiente proteína del serogrupo A [35] tiene el número de acceso del GenBank 7379057. Cuando se usa según la presente invención, la proteína 287 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de la 287 son variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, el N-terminal de la 287 puede estar delecionado hasta, e incluyendo, su secuencia de poliglicina (por ejemplo, delección de los residuos 1 a 24 para la cepa MC58, para dar AG287 [ID. SEC. N°: 6 de este documento]). Esta delección puede mejorar la expresión. Las secuencias de 287 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o más (por ejemplo, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. N°: 6. Las secuencias preferidas de 287 comprenden un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. N°: 6, donde n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 287. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del C-terminal y/o del N-terminal de la ID. SEC. N°: 6. Estas secuencias incluyen variantes de la 287 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Las formas alélicas de la 287 pueden observarse en las Figuras 5 y 15 de la referencia 28, y en el ejemplo 13 y en la figura 21 de la referencia 25 (ID. SEC. 3179 a 3184).

Los cinco antígenos básicos de la MenB (NadA, 741, 953, 936 & 287) pueden estar presentes en la composición como cinco proteínas individuales, pero se prefiere que al menos dos de los antígenos se expresen como una cadena polipeptídica (una proteína 'híbrida' [refs. 29 a 31]), es decir, de forma que los cinco antígenos formen menos de cinco polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas: en primer lugar, puede ayudarse a una proteína que puede ser inestable o poco expresada por sí misma añadiendo un compañero híbrido adecuado que solucione el problema; en segundo lugar, la elaboración comercial se simplifica ya que sólo se necesita emplear una expresión y purificación con objeto de producir dos proteínas útiles por separado. Una proteína híbrida incluida en una composición de la invención puede comprender dos o más (es decir, 2, 3, 4 ó 5) de los cinco antígenos básicos. Se prefieren los híbridos consistentes en dos de los cinco antígenos.

Dentro de la combinación de los cinco antígenos básicos, un antígeno puede estar presente en más de una proteína híbrida y/o como una proteína no híbrida. Sin embargo se prefiere que haya un antígeno presente bien como un híbrido o bien como un no híbrido, pero no como ambos, aunque puede ser útil incluir la proteína 741 tanto como un antígeno híbrido como no híbrido (preferiblemente una lipoproteína), particularmente cuando se usa más de una variante de la 741.

Las proteínas híbridas pueden representarse mediante la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que: X es una secuencia de aminoácidos de uno de los cinco antígenos básicos; L es una secuencia de aminoácidos conectora opcional; A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional; y n es 2, 3, 4 ó 5.

Si una fracción -X- tiene una secuencia peptídica líder en su forma natural, esta puede incluirse u omitirse en la proteína híbrida. En algunas formas de realización, los péptidos líder serán deseleccionados excepto aquel de la fracción -X- ubicado en el N- terminal de la proteína híbrida, es decir, se conservará el péptido líder de X_1 , pero los péptidos líder de $X_2 \dots X_n$ se omitirán. Esto es equivalente a seleccionar todos los péptidos líder y usar el péptido líder de X_1 como fracción -A-.

Por cada n casos de $[\text{-X-L-}]$, la secuencia de aminoácidos conectora -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n=2$, el híbrido puede ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, etc. La(s) secuencia(s) de aminoácidos conectora(s) -L- serán típicamente cortas (por ejemplo, de 20 o menos aminoácidos, es decir, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos comprenden secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, conectores de poliglicina (es decir, que comprenden Glyn donde $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), y colas de histidina (es decir, His_n donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos conectoras serán apreciables por los expertos en la materia. Un conector útil es GSGGGG (ID. SEC. 9), estando formado el dipéptido Gly-Ser a partir de un sitio de restricción *Bam*HI, ayudando así a la clonación y la manipulación, y siendo el tetrapéptido $(\text{Gly})_4$ un conector típico de poli- glicina. Si X_{n+1} es una proteína ΔG y L_n es un conector de glicina, esta puede ser equivalente a que X_{n+1} no sea una proteína ΔG y L_n esté ausente.

-A- es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional. Esta será típicamente corta (por ejemplo, de 40 aminoácidos o menos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo, colas de histidina, es decir, His_n donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos N-terminal adecuada serán apreciables por los expertos en la materia. Si X_1 carece de su propia

metionina N-terminal, -A- es preferiblemente un oligopéptido (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) que proporciona una metionina N-terminal.

-B- es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional. Esta será típicamente corta (por ejemplo, de 40 aminoácidos o menos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo que comprenden colas de histidina, es decir, His_n donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), o secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácidos C-terminal adecuadas serán apreciables por los expertos en la materia.

Muy preferiblemente, n es 2. Los híbridos de los antígenos para su uso en la invención comprenden: NadA & 741; NadA & 936; NadA & 953; NadA & 287; 741 & 936; 741 & 953; 741 & 287; 936 & 953; 936 & 287; 953 & 287. Dos proteínas preferidas son: X_1 es una 936 y X_2 es una 741; X_1 es una 287 y X_2 es una 953.

Dos proteínas híbridas particularmente preferidas de la invención son como sigue:

n	A	X_1	L_1	X_2	L_2	B	ID. SEC. N°:
2	MA	$\Delta G287$	GSGGGG	953 ^(NL)	-	-	7
2	M	936 ^(NL)	GSGGGG	$\Delta G741$	-	-	8

Estas dos proteínas pueden usarse en combinación con NadA (particularmente con la ID. SEC. N°: 2). Así, una composición preferida de antígenos de MenB para su uso para invención incluye por tanto un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. N°: 2, un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. N°: 7 y un tercer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. N°: 8. Este es un grupo preferido de antígenos de MenB para su uso con la invención.

Según se mencionó anteriormente, las composiciones de la invención que incluyen antígenos de MenB pueden inducir preferiblemente una respuesta sérica de anticuerpos bactericidas que es eficaz frente a dos o tres de los linajes hipervirulentos de MenB A4, ET-5 y el linaje 3. Adicionalmente pueden inducir respuestas de anticuerpos bactericidas frente a uno o más linajes hipervirulentos del subgrupo a I, del subgrupo III, del subgrupo IV-1 o del complejo ET-37, y frente a otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Estas respuestas de anticuerpos se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [véase, por ejemplo, la nota final 14 de la referencia 22]. La actividad bactericida sérica (*serum bactericidal activity*, SBA) mide la destrucción bacteriana mediada por el complemento, y puede ensayarse usando complemento humano o de cría de ratón. Los estándares de la WHO requieren una vacuna que induzca al menos un aumento de cuatro veces en la SBA en más del 90% de los receptores

La composición no debe inducir anticuerpos bactericidas frente a todas y cada una de las cepas de MenB dentro de estos linajes hipervirulentos; más bien, para cualquier grupo dotado de cuatro o más cepas de meningococos del serogrupo B dentro de un linaje hipervirulento en particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas frente al menos el 50% (por ejemplo, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o más) del grupo. Los grupos preferidos de cepas incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. El suero tiene preferiblemente un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o mayor, preferiblemente de al menos 2^{14}), es decir, el suero es capaz de destruir al menos el 50% de las bacterias de la prueba de una cepa en particular cuando se diluye a 1/1024, según se describe en la referencia 22. Las composiciones preferidas pueden inducir respuestas bactericidas frente a las siguientes cepas de meningococos del serogrupo B: (i) del agregado A4, las cepas 961-5945 (B:2b:P1.21,16) y/o la cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5, la cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) y/o la cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, la cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o la cepa BZ198 (B:NT:-). Las composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas frente a las cepas 961-5945, 44/76 y 394/98. Las cepas 961-5945 y G2136 son ambas cepas de referencia de *Neisseria* MLST [ids 638 & 1002 en la ref. 39]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (por ejemplo, ATCC BAA- 335) y era la cepa secuenciada en la referencia 21. La cepa 44/76 se ha usado y caracterizado ampliamente (por ejemplo, ref. 40) y es una de las cepas de referencia de *Neisseria* MLST [id 237 en la ref. 39; fila 32 de la Tabla 2 en la ref. 41]. La cepa 394/98 se aisló originalmente en Nueva Zelanda en 1998, y se han publicado diversos estudios usando esta cepa (por ejemplo, en las refs. 42 & 43). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia de MLST [id 409 en la ref. 39; fila 41 de la Tabla 2 en la ref. 41]. La composición puede inducir adicionalmente una respuesta bactericida frente a la cepa LNP17592 del serogrupo W135 (W135:2a:P1.5,2), del complejo ET-37. Esta es una cepa Haji aislada en Francia en 2000.

Otros antígenos polipeptídicos de MenB que pueden incluirse en las composiciones de la invención incluyen aquellos que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ID. SEC. N°: 650 de la ref. 23; ID. SEC. N°: 878 de la ref. 23; ID. SEC. N°: 884 de la ref. 23; ID. SEC. N°: 4 de la ref. 24; ID. SEC. N°: 598 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 818 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 864 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 866 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 1196 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 1272 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 1274 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 1640 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 1788 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2288 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2466 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2554 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2576 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2606 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2608 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2616 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2668 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2780 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2932 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2958 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2970 de la ref. 25; ID. SEC. N°: 2988 de la ref. 25, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene una identidad del 50% o más (por ejemplo, del 60%, del 70%, del 80%, del 90%, del 95%, del 99% o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, donde n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos para (b) comprenden un epitopo de la secuencia relevante. Puede incluirse más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos

***Haemophilus influenzae* de tipo B (Hib)**

Cuando la composición incluye un antígeno de *H. influenzae* de tipo B, sera típicamente un antígeno del sacárido capsular de Hib. Los antígenos de sacáridos de *H. influenzae* b son bien conocidos.

Ventajosamente, el sacárido de Hib esta conjugado covalentemente con una proteína portadora con objeto de mejorar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de los conjugados de polisacáridos en general, y del polisacárido capsular de Hib en particular, está bien documentada [por ejemplo, referencias 44 a 52 etc.]. La invención puede usar cualquier conjugado de Hib adecuado. Algunas proteínas portadoras adecuadas se describen a continuación, y los portadores preferidos para los sacáridos de Hib son CRM₁₉₇ ('HbOC'), el toxoide tetánico ('PRP-T') y el complejo de la membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

La fracción de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato de polirribosilribitol completo (PRP)), pero se prefiere hidrolizar los polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo, con un PM desde ~1 hasta ~5 kDa).

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido de Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ a través de un conector de ácido adípico [53, 54]. El toxoide tetánico también es un portador preferido.

La administración del antígeno de Hib da como resultado preferiblemente una concentración de anticuerpos antiPRP de ≥ 0 , 15 $\mu\text{g/ml}$, y más preferiblemente de ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$.

Las composiciones de la invención pueden comprender más de un antígeno de Hib.

Cuando una composición incluye un antígeno sacárido de Hib, se prefiere que no incluya también un coadyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un coadyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno de Hib puede adsorberse al coadyuvante [55] o puede no adsorberse [12]. La prevención de la absorción puede conseguirse seleccionando el pH correcto durante la mezcla del antígeno/coadyuvante, un coadyuvante con un punto apropiado de carga cero, y un orden apropiado de mezcla de los diversos antígenos diferentes en una composición [56].

Los antígenos de Hib pueden estar liofilizados, por ejemplo, junto con antígenos de meningococos.

Streptococcus pneumoniae

Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, sera típicamente un antígeno de sacárido capsular que esta preferiblemente conjugado con una proteína portadora [por ejemplo, refs. 57 a 59]. Se prefiere que incluya sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se usan ampliamente mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes, ya que son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [60]. Por ejemplo, PreVNar™ [61] contiene antígenos de siete serotipos (4,6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con CRM₁₉₇ mediante una aminación reductora, con 2 μg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 μg del serotipo 6B), y con conjugados adsorbidos sobre un coadyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluyen preferiblemente al menos los serotipos 6B, 14, 19F Y 23F. Los conjugados pueden estar adsorbidos sobre un fosfato de aluminio.

Como alternativa al uso de antígenos de sacáridos de meningococos, la composición puede incluir uno o más antígenos polipeptídicos. Están disponibles las secuencias genómicas de diversas cepas de neumococos [62,63] y pueden someterse a una vacunología inversa [64-67] para identificar los antígenos polipeptídicos adecuados [68,69]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los siguientes antígenos: PhtA, PhtD,

PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 Y Sp130, según se define en la referencia 70. La composición puede incluir más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 136 14) de estos antígenos.

5 En algunas formas de realización, la composición puede incluir tanto antígenos sacáridos como polipeptídicos de neumococos. Estos pueden usarse en una mezcla simple, o puede conjugarse el antígeno sacárido de neumococo con una proteína de neumococo. Las proteínas portadoras adecuadas para dichas formas de realización incluyen los antígenos enumerados en el párrafo previa [70].

10 Los antígenos de neumococos pueden liofilizarse, por ejemplo, junto con antígenos de meningococos y/o de Hib.

Sacáridos del serogrupo A modificado de *N. meningitidis*

15 La composición de la invención incluye un antígeno sacárido de MenA. El antígeno es preferiblemente un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo del sacárido natural han sido reemplazados por un grupo bloqueante [19]. Esta modificación aumenta la resistencia a la hidrólisis, y significa que el antígeno del serogrupo A puede almacenarse y usarse en una formulación líquida en lugar de requerir una liofilización.

20 El número de unidades de monosacáridos con grupos bloqueantes puede variar. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueantes. Alternativamente, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueantes. Al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueantes.

25 Asimismo, el número de grupos bloqueantes en una unidad de monosacárido puede variar. Por ejemplo, el número de grupos bloqueantes en una unidad de monosacárido puede ser de 1 ó 2. El grupo bloqueante estará generalmente en la posición 4 y/o en la posición 3 de las unidades de monosacáridos.

30 La unidad de monosacárido terminal puede tener o no un grupo bloqueante en lugar de su hidroxilo. Se prefiere que conserve un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad de monosacárido terminal con objeto de proporcionar un brazo para regiones adicionales (por ejemplo, de conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos pueden convertirse en grupos amino ($-NH_2$ o $-NH-E$, donde E es un grupo protector de nitrógeno) mediante una aminación reductora (usando, por ejemplo, $NaBH_3CN/NH_4Cl$), y pueden ser regenerados posteriormente después de que otros grupos hidroxilo se hayan convertido en grupos bloqueantes.

35 Los grupos bloqueantes que sustituyen los grupos hidroxilo pueden ser accesibles directamente a través de una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo por otro grupo. Algunos derivados adecuados de grupos hidroxilo que actúan como grupos bloqueantes son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo, éteres de sililo o éteres de alquilo) y acetales. Algunos ejemplos específicos de dichos grupos bloqueantes son alilo, Aloe, bencillo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos bloqueantes que no son directamente accesibles y que rempazan completamente el grupo hidroxilo incluyen alquilo C_{1-12} , alquilo C_{3-12} , arilo C_{5-12} , arilo C_{5-12} -alquilo C_{1-6} , NR^1R^2 (R^1 y R^2 se definen en el siguiente párrafo), H, F, Cl, Br, CO_2H , CO_2 (alquilo C_{1-6}), CN, CF_3 , CCl_3 , etc. Los grupos bloqueantes preferidos son grupos capturadores de electrones.

45 Los grupos bloqueantes preferidos tienen la fórmula: $-O-X-Y$ u $-OR^3$ en la que: X es C(O), S(O) o SO_2 ; Y es alquilo C_{1-12} , alcoxi C_{1-12} , cicloalquilo C_{3-12} , arilo C_{5-12} o arilo C_{5-12} -alquilo C_{1-6} , cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos elegidos independientemente de entre F, Cl, Br, CO_2H , CO_2 (alquilo C_{1-6}), CN, CF_3 o CCl_3 ; o Y es NR^1R^2 ; R^1 y R^2 se eligen independientemente de entre H, alquilo C_{1-12} , cicloalquilo C_{3-12} , arilo C_{5-12} , arilo C_{5-12} -alquilo C_{1-6} ; o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C_{3-12} ; R^3 es alquilo C_{1-12} o cicloalquilo C_{3-12} , cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 grupos elegidos independientemente de entre F, Cl, Br, CO_2 (alquilo C_{1-6}), CN, CF_3 o CCl_3 ; o R^3 es arilo C_{5-12} o arilo C_{5-12} -alquilo C_{1-6} , cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos elegidos de entre F, Cl, Br, CO_2H , CO_2 (alquilo C_{1-6}), CN, CF_3 o CCl_3 . Cuando R^3 es un alquilo C_{1-12} o un cicloalquilo C_{3-12} , típicamente está sustituido con 1, 2 o 3 grupos según se definió anteriormente. Cuando R^1 y R^2 están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado C^{3-12} , se entiende que R^1 y R^2 , junto con el átomo de nitrógeno, forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12}). El grupo heterocíclico puede contener 1 ó 2 heterótermos (tales como N, O, o S) distintos al átomo de nitrógeno. Algunos ejemplos de grupos heterocíclico saturados C_{3-12} son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperacinilo, imidazolidinilo, acetidinilo y aciridinilo.

60 Los grupos bloqueantes $-O-X-Y$ y $-OR^3$ pueden prepararse a partir de grupos $-OH$ mediante procedimientos de derivatización estándar, tales como la reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, un haluro de alquilo, un haluro de sulfonilo, etc. Por lo tanto, el átomo de oxígeno de $-O-X-Y$ es preferiblemente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo $-X-Y$ de $-O-X-Y$ reemplaza preferiblemente al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

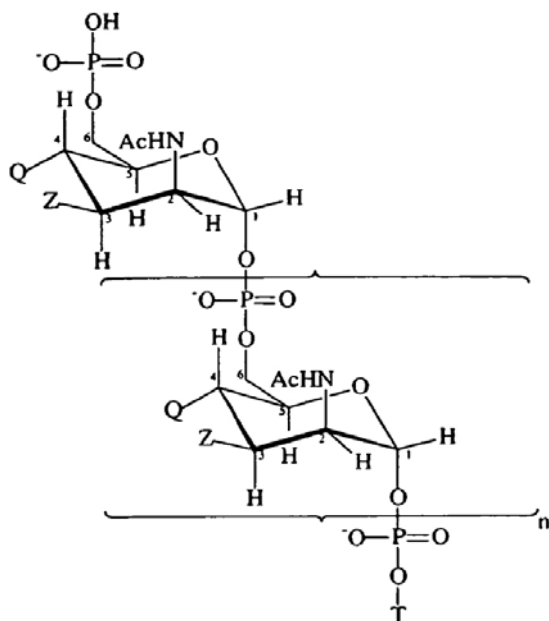
Alternativamente, los grupos bloqueantes pueden ser accesibles a través de una reacción de sustitución, tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros procedimientos para preparar grupos bloqueantes a partir de grupos hidroxilo son bien conocidos.

Mas preferiblemente, el grupo bloqueante es $-\text{OC}(\text{O})\text{CF}_3$ [71], o un grupo carbamato $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, donde R^1 y R^2 se eligen independientemente de entre alquilo C_{1-6} . Mas preferiblemente, R^1 y R^2 son ambos metilo, es decir, el grupo bloqueante es $-\text{OC}(\text{O})\text{NMe}_2$. Los grupos bloqueantes de carbamato tienen un efecto estabilizante sobre el enlace glucosídico, y pueden prepararse en condiciones suaves.

Los sacáridos modificados preferidos de MenA contienen n unidades de monosacáridos, donde al menos el $h\%$ de las unidades de monosacáridos no tienen grupos $-\text{OH}$ en las dos posiciones 3 y 4. El valor de h es de 24 o más (por ejemplo, de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 a 100) y preferiblemente es de 50 o más. Los grupos $-\text{OH}$ ausentes son preferiblemente grupos bloqueantes, según se definió anteriormente.

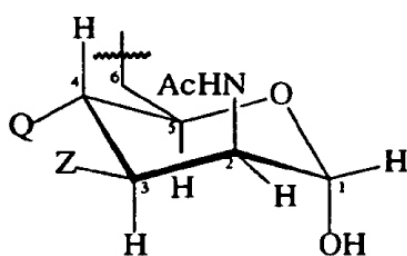
Otros sacáridos modificados preferidos de MenA comprenden unidades de monosacáridos en las que al menos s de las unidades de monosacáridos no tienen el $-\text{OH}$ en la posición 3 y no tienen el $-\text{OH}$ en la posición 4. El valor de s es de al menos 1 (por ejemplo, de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 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). Los grupos $-\text{OH}$ ausentes son preferiblemente grupos bloqueantes, según se definió anteriormente.

Los sacáridos modificados adecuados MenA para su uso con la invención tienen la fórmula:

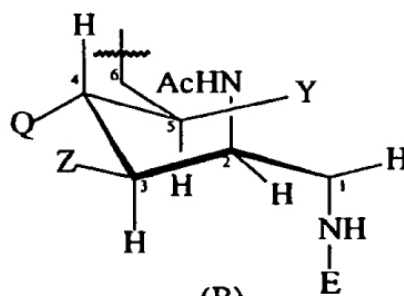


en la que

n es un número entero entre 1 y 100 (preferiblemente un número entero entre 15 y 25);
 T tiene la fórmula (A) o (B):



(A)



(B)

cada grupo Z se elige independientemente de entre OH o un grupo bloqueante según se definió anteriormente; y cada grupo Q se elige independientemente de entre OH o un grupo bloqueante según se definió anteriormente;

Y se elige de entre OH o un grupo bloqueante según se definió anteriormente;

E es H o un grupo protector de nitrógeno;

y donde más de aproximadamente el 7% (por ejemplo, el 8%, el 9%, el 10% o más) de los grupos Q son grupos bloqueantes.

Cada uno de los grupos $n+2$ Z pueden ser iguales o diferentes entre sí. Asimismo, cada uno de los grupos $n+2$ Q pueden ser iguales o diferentes entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Alternativamente, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50% o el 60% de los grupos Z pueden ser OAc. Preferiblemente, aproximadamente el 70% de los grupos Z son OAc, siendo el resto de los grupos Z OH o grupos bloqueantes según se definió anteriormente. Al menos aproximadamente el 7% de los grupos Q son grupos bloqueantes. Preferiblemente, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o incluso el 100% de los grupos Q son grupos bloqueantes.

Las composiciones preferidas de la invención pueden almacenarse durante 28 días a 37° C y después de ese periodo, menos del $f\%$ de la cantidad inicial total del sacárido conjugado de MenA no estará conjugado, donde f es 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o inferior.

Oligosacáridos

Los sacáridos capsulares se usaran generalmente en forma de oligosacáridos. Estos se forman convenientemente mediante la fragmentación de un polisacárido capsular purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis), que habitualmente estará seguida por la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

La fragmentación de los polisacáridos se realiza preferiblemente para dar un grado de polimerización medio final 5 (*degree of polymerisation*, DP) en el oligosacárido de menos de 30 (por ejemplo, de entre 10 y 20, preferiblemente de alrededor de 10 para el serogrupo A; de entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferiblemente de alrededor de 15-20; de entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El DP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [72].

Los antígenos de sacáridos de MenC preferidos se desvelan en la referencia 10, según se usan en MenjugateTM.

Si se realiza una hidrólisis, el hidrolizado se dimensionara generalmente con objeto de eliminar los oligosacáridos cortos [73]. Esto puede conseguirse de varias formas, tal como una ultrafiltración seguida de una cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización de menos de, o igual a, aproximadamente 6, preferiblemente se eliminan para el serogrupo A, y aquellos de menos de alrededor de 4 preferiblemente se eliminan para los serogrupos W135 e Y.

Conjugación covalente

Los sacáridos capsulares de las composiciones de la invención estarán conjugados habitualmente con proteína(s) portadora(s). En general, la conjugación mejora la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte desde antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T, permitiendo así el cebado de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil en vacunas [por ejemplo, ref. 74] y es una técnica bien conocida, por ejemplo, revisada en las refs. 44 a 52, etc.].

Las proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como el toxoide diftérico o el toxoide tetánico. Se prefiere particularmente en toxoide diftérico CRM197 [75-77]. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana exterior de *N. meningitidis* [78], péptidos sintéticos [79,80], proteínas de choque térmico [81,82], proteínas tosferínicas [83, 84], citocinas [85], linfoquinas [85], hormonas [85], factores de crecimiento [85], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos [86], la proteína D de *H. influenzae* [87,88], la proteína superficial meningocócica PspA [89], proteínas de captación de hierro [90], la toxina A 0 B de *C. difficile* [91], etc. Los portadores preferidos son el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, la proteína O de *H. influenzae* y CRM₁₉₇.

En una composición de la invención es posible usar más de una proteína portadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de la supresión del portador. Por lo tanto, pueden usarse diferentes proteínas portadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A podrían conjugarse con CRM₁₉₇, mientras que los sacáridos del serogrupo C podrían conjugarse con el toxoide tetánico. También es posible usar más de una proteína portadora para un antígeno sacárido en particular, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM₁₉₇ y otros conjugados con el toxoide tetánico. En general, sin embargo, se prefiere usar la misma proteína portadora para todos los sacáridos,

Una única proteína portadora podría aportar más de un antígeno sacárido [92]. Por ejemplo, una única proteína portadora podría tener conjugados sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general, se prefiere tener conjugados por separado para cada serogrupo.

Se prefieren los conjugados con una proporción sacaridoproteína (p/p) de hasta 1:5. Se prefieren las proporciones de hasta 1:2, mientras que las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5 son mas preferidas.

Los conjugados pueden usarse junto con una proteína portadora libre [93]. Cuando hay presente una proteína portadora dada tanto en forma libre como en forma conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferiblemente de no más del 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, y más preferiblemente está presente en menos del 2% en peso.

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado donde sea necesario.

El sacárido será típicamente activado o funcionalizado antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos cianilantes tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio [94, 95, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidracidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción de la referencia 50).

Las uniones a través de un grupo conector pueden realizarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 96 y 97. Un tipo de unión implica una aminación reductora del polisacárido, acoplar el grupo amino resultante con un extremo de un grupo conector de ácido adípico, y después acoplar una proteína en el otro extremo del grupo conector de ácido adípico [48, 98, 99]. Otros conectores incluyen 55 B-propionamida [100], nitrofeniletilamina [101], haluros de haloácido [102], uniones glucosídicas [103], ácido 6-aminocaproico [104], ADH [105], fracciones C4 a C12 [106] etc. Como alternativa al uso de un conector, puede usarse una unión directa. Las uniones directas a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido seguido por una aminación reductora con la proteína, según se describe, por ejemplo, en las referencias 107 y 108.

Se prefiere un proceso que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, reemplazando los 5 grupos terminales =O por -NH₂) seguido de una derivatización con diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y la reacción con la proteína portadora. Otra reacción preferida usa una activación de CDAP con una proteína portadora D, por ejemplo, para MenA o MenC.

Tras la conjugación pueden separarse los sacáridos libres de los conjugados. También hay muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía de interacciones hidrófobas, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc. [véanse también las refs. 109 & 110, etc.].

Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, se prefiere que la preparación del oligosacárido preceda a la conjugación.

Preparación de las composiciones de la invención

Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. Los sacáridos se preparan preferiblemente por separado (incluyendo cualquier fragmentación, conjugación, etc.) y después se mezclan para dar una composición de la invención.

Se prefiere que el sacárido del serogrupo A no se combine con otro(s) sacárido(s) poco antes de su uso, con objeto de minimizar el potencial de hidrólisis. Esto puede conseguirse convenientemente teniendo el componente del serogrupo A (típicamente junto con los excipientes apropiados) en forma liofilizada y el (los) otro componente(s) de serogrupo(s) en forma líquida (también con los excipientes apropiados), usándose los componentes líquidos para reconstituir el componente liofilizado de MenA cuando esté listo para su uso. Cuando se usa un coadyuvante de sal de aluminio, se prefiere incluir el coadyuvante en el vial que lo contiene con la vacuna líquida, y liofilizar el componente de MenA sin coadyuvante.

Una composición de la invención puede prepararse por tanto a partir de un kit que comprende: (a) sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, en forma liofilizada; y (b) sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis* en forma líquida. Le invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición de la invención, que comprende mezclar un sacárido capsular liofilizado del serogrupo A de *N. meningitidis* con sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, donde dichos sacáridos están en forma líquida.

La invención también proporciona una composición de la invención que comprende sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, donde los sacáridos están en forma líquida. Esta composición se

envasa con un antígeno sacárido liofilizado del serogrupo A, para su reconstitución.

Presentación de las composiciones de la invención

5 Las composiciones de la invención pueden presentarse y envasarse de varias formas.

10 Las composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringas precargadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una única dosis o múltiples dosis. Las composiciones inyectables serán habitualmente disoluciones o suspensiones líquidas. Alternativamente, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) para su disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

15 Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiples. Para las formas de dosis múltiples, se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

20 Cuando una composición de la invención va a prepararse extemporáneamente antes de su uso (por ejemplo, cuando el sacárido del serogrupo A se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa precargada y un vial, usándose el contenido de la jeringa para reactivar los componentes del vial antes de la inyección.

25 En cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual será generalmente de más de 1 µg (medida como masa de sacárido), siendo preferido aproximadamente 2,5 µg, 5 µg o 10 µg de cada uno. Con unas proporciones ponderales de A:C:W135:Y de 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1, por lo tanto la cantidad representada por la figura 1 es preferiblemente de aproximadamente 2,5 µg, 5 µg o 10 µg.

30 Las composiciones preferidas tienen aproximadamente los siguientes µg de sacárido por dosis:

35	A	10	5	2.5
	C	5	5	2.5
	W135	5	5	2.5
	Y	5	5	2.5

40 Las composiciones de la invención comprenden ≤25 µg de sacárido meningococo por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤20 µg de sacárido meningococo por dosis. Las composiciones de la invención comprenden al menos 10 µg de sacárido meningococo por dosis.

45 Las composiciones de la invención son preferiblemente estériles. Preferiblemente están exentas de pirógenos. Preferiblemente están tamponadas, por ejemplo, a un pH de entre 6 y 8, generalmente alrededor de pH 7. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [111]. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Coadyuvantes

50 Las composiciones incluirán generalmente uno o más coadyuvantes. El (los) coadyuvante(s) puede(n) añadirse a los sacáridos antes y/o después de que sean mezclados para formar una composición de la invención, pero se prefiere combinar el coadyuvante con un antígeno sacárido antes de mezclar los diferentes sacáridos,

55 Sin embargo, no es necesario que cada sacárido sea coadyuvado antes de dicha mezcla. Puede incluirse un exceso de coadyuvante en una preparación de sacárido de forma que, cuando se añade(n) antígeno(s) sacárido(s) no coadyuvado(s) adicional(es), el exceso se diluye hasta una concentración final deseada. En una forma de realización particular, cuando la composición de la invención se prepara a partir de un antígeno liofilizado (por ejemplo, un componente liofilizado del serogrupo A) puede preferirse no incluir un coadyuvante en el material liofilizado.

60 Los coadyuvantes preferidos para su inclusión en las composiciones de la invención son sales de aluminio (alum), tales como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc. [capítulos 8 & 9 en la ref. 112]. Particularmente se prefiere el hidroxifosfato de aluminio, particularmente en composiciones que incluyen un antígeno sacárido de *H. influenzae*, y un coadyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar PO₄/Al de entre 0,84 y 0,92,

incluido a 0,6 mg Al^{3+} /ml. Puede usarse la adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo, de entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado y por dosis. Cuando hay más de un conjugado en la composición, no todos los conjugados necesitan estar adsorbidos. Los conjugados de MenC MenjuqateTM y NeisvacTM usan un coadyuvante de hidróxido, mientras que MeningitecTM usa un fosfato.

El fosfato cálcico es otro coadyuvante preferido.

Otros coadyuvantes que pueden usarse además, o en lugar, de las sales de aluminio incluyen:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 & 9 de la ref. 112], 0 mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y siendo preferida la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de una sal retórica [113].

B. Emulsiones oleosas

Las composiciones en emulsiones oleosas adecuadas para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [capítulo 10 de la ref. 112; véase también ref. 114] (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidificador). También pueden usarse el coadyuvante completo de Freund (CFA) y el coadyuvante incompleto de Freund (IFA).

C. Formulaciones de Saponina [capítulo 22 de la ref. 112]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos esteroides y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallo, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina ha sido ampliamente estudiada como coadyuvante. La saponina también puede obtenerse comercialmente a partir de *Smilax omata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (hierba jabonera). Las formulaciones con coadyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como OS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOMs. La QS21 se comercializa como StimulonTM.

Las composiciones con saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Usando estas técnicas se han identificado fracciones purificadas específicas, incluyendo OS7, OS17, OS18, OS21, OH-A, OH-B Y OH-C. Preferiblemente, la saponina es la OS21. Un procedimiento de producción de la OS21 se desvela en la ref. 115. Las formulaciones con saponina también puede comprender un esteroide, tal como colesterol [116].

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 de la ref. 112]. Los ISCOMs incluyen también típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOMs puede usarse cualquier saponina conocida. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOMs se describen adicionalmente en las refs. 116-118. Opcionalmente, los ISCOMs pueden estar desprovistos de detergente adicional [119].

En las refs. 120 & 121 puede encontrarse una revisión del desarrollo de los coadyuvantes basados saponinas.

D. Virosomas y partículas pseudovíricas

También pueden usarse virosomas y partículas pseudovíricas (*virus-like particles*, VLPs) como coadyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus combinadas o formuladas opcionalmente con un fosfolípido. Generalmente no son patógenos ni replicativos, y generalmente no contienen ningún genoma del virus natural. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en virosomas o en VLPs incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA 0 NA), del virus de la Hepatitis B (tales como las proteínas del núcleo o de la capsida), del virus de la Hepatitis E, del virus del sarampión, del virus Sindbis, de rotavirus, del virus Cocksackie (o virus de la enfermedad de manos, pies y boca), de retrovirus, del virus de Norwalk, del virus del papiloma humano, del VIH, de bacteriófagos de AM, del bacteriófago Q β (tales como las proteínas de la cubierta), del bacteriófago GA, del bacteriófago fr, del bacteriófago AP205 y Ty (tales como el retrotransposón Ty y la proteína p1). Las VLPs se discuten adicionalmente en las refs. 122-127. Los virosomas se discuten adicionalmente, por ejemplo, en la ref. 128

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los coadyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacáridos (LPS) de enterobacterias, derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas de ribosilación del ADP y derivados destoxificados de los mismos.

Algunos derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) Y MPL 3-0-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma preferida de "partícula pequeña" del monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se desvela en la ref. 129. Dichas "partículas pequeñas" del 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para ser filtradas estériles a través de una membrana de 0,22 µm [129]. Otros derivados no tóxicos de LPS incluyen miméticos del monofosforil Lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529 [130,131].

Algunos derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia colitales* como OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las refs. 132 & 133.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina). Los AM bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli (dG) también han demostrado ser inmunoestimulantes.

Los CpG's pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones con fosforotioato, y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 134, 135 y 136 desvelan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, el reemplazamiento de guanosina por 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto coadyuvante de los oligonucleótidos con CpG se discute adicionalmente en las refs. 137-142.

La secuencia de CpG puede estar dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT 0 TTCGTT [143]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN con CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de los linfocitos B, tal como un ODN con CpG-B. Los ODNs con CpG-A y CpG-B se discuten en las refs. 144-146. Preferiblemente, el CpG es un tal como un ODN con CpG-A.

Preferiblemente, el oligonucleótido con CpG se construye de forma que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente pueden unirse dos secuencias oligonucleotídicas con CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las refs. 143 & 147-149.

Las toxinas bacterianas de ribosilación del ADP y los derivados destoxificados de los mismos pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E.coli* "LT"), del cólera ("CT") o de tosferina ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación del ADP destoxificadas como coadyuvantes mucosos se describe en la ref. 150 y como coadyuvantes parenterales en la ref. 151. La toxina o el toxoide está preferiblemente en forma de una holotoxina, que comprende ambas subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferiblemente, la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el coadyuvante es una LT mutante destoxificada tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas de ribosilación del ADP y de derivados destoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como coadyuvantes puede encontrarse en las refs. 152-159. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en las alineaciones de las unidades A y B de las toxinas de ribosilación del ADP establecidas en la ref. 160, incorporadas específicamente al presente documento como referencia en su totalidad.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [161], etc.) [162], interferones (por ejemplo, interferón-γ), factor estimulante de las colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

Los bioadhesivos y los mucoadhesivos también pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Algunos bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [163] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosan y los derivados del mismo también pueden usarse como coadyuvantes en la invención [164].

H. Micropartículas

Las micropartículas también pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Se prefieren las

micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm hasta ~150 µm de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm hasta ~30 µm de diámetro y muy preferiblemente de ~500 nm hasta ~10 µm de diámetro) formada a partir de materiales que son biodegradables y no son tóxicos (por ejemplo, un poli(a-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, a polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido), opcionalmente tratadas para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (capítulos 13 & 14 de la ref. 112)

Algunos ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como coadyuvantes se describen en las refs. 165-167.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los coadyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [168]. Dichas formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilén sorbitano en combinación con un octoxinol [169], así como alquiléteres de polioxietileno o ésteres tensioactivos en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como octoxonol [170]. Los éteres de polioxietileno preferidos se eligen del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoril éter, polioxietilen-8-esteoril éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter y polioxietilen-23-lauril éter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones con PCPP se describen, por ejemplo, en las refs. 171 y 172

L. Péptidos de muramilo

Algunos ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen N- acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (tr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina MTP-PE).

M. Compuestos de imidazoquinolona

Algunos ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen Imiquimod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las refs. 173 y 174.

La invención también puede comprender combinaciones de uno o más de los coadyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, en la invención pueden usarse las siguientes composiciones coadyuvantes: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [175]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [176]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [177]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [178]; (6) SAF, que contiene un 10% de escualano, un 0,4% de Tween 80™, un 5% de polímero en bloque de pluronic L121 y thr-MDP, bien microfluidificado en una emulsión submicrométrica o bien sometido a una agitación vorticial para generar una emulsión con un tamaño de partícula mayor. El sistema coadyuvante (7) Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene un 2% de escualano, un 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo formado por monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (*cell wall skeleton*, CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 112.

Cuando se usa un fosfato de aluminio, es posible adsorber uno o más sacáridos a las sales de aluminio, pero se prefiere no hacerlo, y esto se favorece incluyendo iones fosfato libres en disolución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón de fosfato). Cuando se usa un hidróxido de aluminio, se prefiere adsorber los sacáridos a la sal. El uso de hidróxido de aluminio como coadyuvante puede preferirse para el sacárido del serogrupo A.

En las composiciones de la invención es posible adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes de serogrupos de *N. meningitidis* de la invención, hay disponibles, por ejemplo, las siguientes permutaciones:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)															
A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Componentes adicionales de las composiciones

Además de los antígenos descritos anteriormente, las composiciones de la invención pueden incluir antígenos proteicos de meningococos.

También pueden incluirse antígenos que no son de meningococos ni de *Neisseria*, preferiblemente aquellos que no disminuyen la respuesta inmunitaria frente a los componentes de meningococos. La ref. 179, por ejemplo, desvela combinaciones de oligosacáridos de los serogrupos B y C de *N. meningitidis* junto con el sacárido Hib. Se prefieren los antígenos de neumococos, del virus de la hepatitis A, del virus de la hepatitis B, de *B. pertussis*, de difteria, de tétanos, de polio y/o de *H. influenzae*. Los antígenos particularmente preferidos incluyen:

- un antígeno diftérico, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la ref.180].
- un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 180].
- holotoxina tosferínica (*pertussis*, PT) y hemaglutinina filamentosa (*filamentous haemagglutinin*, FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aqlutinoqenos 2 y 3 [por ejemplo, las refs. 181 & 182].
- el antígeno tosferínico celular.
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como el virus inactivado [por ejemplo, 183, 184].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de la superficie y/o el núcleo [por ejemplo, 184, 185], estando el antígeno superficial preferiblemente adsorbido sobre un fosfato de aluminio [186].
- preparaciones de microvesículas [187], 'OMVs naturales' [188], ampollas u otras vesículas de la membrana externa del serogrupo B de *N. meningitidis* [por ejemplo, las refs. 189 a 190 191 192 193 194 etc.]. Estas pueden prepararse a partir de bacterias que han sido manipuladas genéticamente [195-196 197 198], por ejemplo, para incrementar su inmunogenicidad (por ejemplo, hiperexpresan inmunogenos), para reducir la toxicidad, para inhibir la síntesis de los polisacáridos capsulares, para disminuir la expresión de PorA, etc. Pueden prepararse a partir de cepas que forman muchas ampollas [199-200 201 202]. Pueden incluirse vesículas de una *Neisseria* no patógena [203]. Las OMVs pueden prepararse sin el uso de detergentes [204,205]. Pueden expresar en su superficie proteínas que no son de *Neisseria* [206]. Pueden estar deplecionadas en LPS. Pueden mezclarse con antígenos recombinantes [189,207]. Pueden usarse vesículas de bacterias con diferentes subtipos de proteínas de la membrana exterior de clase I, por ejemplo, seis subtipos diferentes [208,209] usando dos poblaciones de vesículas diferentes modificadas genéticamente que muestran cada una tres subtipos, o nueve subtipos diferentes usando tres poblaciones de vesículas diferentes modificadas genéticamente que muestran cada una tres subtipos, etc. Algunos subtipos útiles incluyen: 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; P1.18-1,3,6.
- antígeno(s) de polio [por ejemplo, 210,211] tales como IPV.

La mezcla puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales, que pueden estar destoxificados cuando sea necesario (por ejemplo, la destoxificación de la toxina tosfeínica mediante un medio químico y/o genético),

Cuando se incluye un antígeno diftérico la mezcla también se prefiere incluir un antígeno tetánico y antígenos tosferínicos. De forma similar, cuando se incluye un antígeno tetánico se prefiere incluir también antígenos diftéricos y tosferínicos. De forma similar, cuando se incluye un antígeno tosferínico también se prefiere incluir antígenos diftéricos y tetánicos. Dichas combinaciones de DTP pueden usarse para reconstituir conjugados liofilizados.

Los antígenos de la mezcla están típicamente presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada

uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno.

Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la mezcla, puede usarse un ácido nucleico que codifica para el antígeno. Los componentes proteicos de la mezcla pueden sustituirse por tanto por ácidos nucleicos (preferiblemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica para la proteína. De forma similar, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que mimetizan antígenos sacáridos, por ejemplo, mimótopos [212] o anticuerpos anti-idiotípicos. Estos pueden sustituir a los componentes sacarinos individuales, o pueden complementarios. Como ejemplo, la vacuna puede comprender un péptido mimético del polisacárido capsular de MenC [213] o de MenA [214] en lugar del propio sacárido.

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se envasan en un formato de dosis múltiples.

Las composiciones de la invención pueden comprender detergente (por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80) a bajos niveles (por ejemplo, <0,01 %).

Las composiciones de la invención pueden incluir sales sódicas (por ejemplo, cloruro sódico) para aportar tonicidad. Es típica una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl.

Las composiciones de la invención incluirán generalmente un tampón. Es típico un tampón de fosfato.

Las composiciones de la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa [215] o trehalosa [216]) por ejemplo, a aproximadamente 15-30 mg/ml (por ejemplo, 25 mg/ml), particularmente si van a ser liofilizados o si incluyen material que ha sido reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para liofilización puede ajustarse hasta aproximadamente 6,1 antes de la liofilización.

La invención proporciona la composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende adicionalmente sacarosa. Los sacáridos son preferiblemente oligosacáridos. La composición puede contener al menos 10 µg y <25 µg de sacárido meningococo por dosis (por ejemplo, ≤ 20 µg, 10 µg). Se puede usar el sacárido MenA modificado. La composición puede estar en forma acuosa o seca (por ejemplo, liofilizada). Cuando está en forma acuosa, la concentración de sacarosa es preferiblemente de entre 5-50 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 25 mg/ml. Cuando esta forma liofilizada, se prefiere que la composición no incluya un coadyuvante de sal de aluminio. La composición puede comprender adicionalmente un antígeno de uno o más de (a) serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo B; y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*.

Immunogenicidad

Las composiciones de la invención son inmunógenas. Las composiciones inmunógenas preferidas son las vacunas. Las vacunas según la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad tras la infección), pero típicamente serán profilácticas.

Las composiciones inmunógenas y las vacunas de la invención comprenderán, además de los antígenos descritos anteriormente, típicamente 'portadores farmacéuticamente aceptables', que incluyen cualquier portador que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son típicamente grandes macromoléculas de metabolismo lento tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, polímeros de aminoácidos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa [216], lactosa, agregados lipídicos (tales como gotitas oleosas o liposomas) y partículas de virus inactivos. Dichos portadores son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes tales como agua, suero salino, glicerol, etc. Adicionalmente puede haber presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Un portador típico es una disolución salina fisiológica estéril tamponada con fosfato exenta de pirógenos. Una detallada discusión sobre excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la ref. 217.

Las composiciones inmunógenas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de cada antígeno, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una única dosis o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud, del estado físico del individuo que se va a tratar, de la edad, del grupo taxonómico que se va a tratar (por ejemplo, primates no humanos, seres humanos, etc.), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar los anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la valoración del médico responsable de la situación médica, y de otros factores relevantes. La cantidad esta en el relativamente amplio intervalo que puede determinarse mediante ensayos rutinarios, y una cantidad típica de cada antígeno sacárido de meningococo por dosis está entre 1 µg Y 20 µg por ejemplo, aproximadamente 1 µg,

aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg (expresada como sacárido).

La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse administrándolas a sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales [218]) y determinando después los parámetros estándar, incluyendo los anticuerpos bactericidas séricos (*serum bactericidal antibodies*, SBA) y los títulos de ELISA (GMT) de la IgG total y anti-capsula de alta avidéz. Estas respuestas inmunitarias se determinarán generalmente alrededor de 4 semanas 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 en los SBA de al menos 4 veces o de 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, puede realizarse más de una determinación post-administración.

Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio de seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado por encima del cual un hospedador se considera seroconvertido frente al antígeno son bien conocidos, y dichos títulos están publicados por organizaciones tales como la WHO. Preferiblemente es seroconvertida mas del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos, mas preferiblemente más del 90%, aun mas preferiblemente más del 93% y muy preferiblemente el 96-100%.

Administración de las composiciones de la invención

Las composiciones de la invención son inyectables.

La inyección parenteral puede ser subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alterativamente puede usarse una inyección sin aguja. Un valor de dosis intramuscular típico es de 0,5 ml.

La administración puede ser en un programa de dosis única o en un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de recuerdo. Un programa de inmunización primaria puede esta seguido por un programa de dosis de recuerdo. La sincronización adecuada entre las dosis de cebado (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre cebado y recuerdo, pueden determinarse rutinariamente.

La administración se realizara generalmente a un animal, y en particular, pueden tratarse sujetos humanos. Las composiciones son particularmente útiles para vacunar a niños y adolescentes.

Usos médicos

La invención proporciona el uso en la elaboración de un medicamento inyectable para desencadenar una respuesta inmunitaria en un paciente, de una composición de la invención. La respuesta inmunitaria es preferiblemente protectora frente a una enfermedad meningocócica, y puede comprender una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular. El paciente es preferiblemente un niño.

El medicamento puede desencadenar una respuesta de recuerdo en un paciente que ya ha sido vacunado frente a *N. meningitidis*.

La invención también proporciona el uso de (i) sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*, en el que dichos sacáridos capsulares están conjugados con proteína(s) portadora(s) y/o son oligosacáridos, y (ii) un antígeno de uno o más de (a) el serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo B; y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*, en la elaboración de un medicamento inyectable para desencadenar una respuesta inmunitaria en un animal. El medicamento es preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de la meningitis bacteriana.

Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección bacteriana tras la administración de la composición de la invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias frente a los antígenos administrados tras la administración de la composición.

Hospedador heterólogo

Aunque la expresión de los polipéptidos para su uso en las composiciones de la invención puede tener lugar en el hospedador natural (por ejemplo, en una *N. meningitidis* o en un *S. pneumoniae*), se usa preferiblemente un hospedador heterólogo. El hospedador heterólogo puede ser procariota (por ejemplo, una bacteria) o eucariota. Preferiblemente es *E. coli*, pero otros hospedadores adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*

typhi, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, micobacterias (por ejemplo, *M. tuberculosis*), levaduras, etc.

General

El termino "que comprende" significa "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El termino "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 esta "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Las cepas bacterianas pueden indicarse como un subíndice, por ejemplo, 741_{MC58} es la proteína 741 de la cepa MC58. Salvo que se indique de otro modo, las proteínas mencionadas en este documento (por ejemplo, sin subíndice) son de la cepa 2996 de *N. meningitidis*, que puede tomarse como una cepa de 'referencia'. Se apreciara, sin embargo, que la invención no está limitada en general por la cepa. Según se menciono anteriormente, las preferencias generales hacia una proteína (por ejemplo, '287', '919', etc.) pueden considerarse que incluyen esa proteína de cualquier cepa. Esta tendrá típicamente una identidad de secuencia con 2996 del 90% o más (por ejemplo, del 91%, del 92%, del 93%, del 94%, del 95%, del 96%, del 97%, del 98%, del 99% o más). Cuando se usan proteínas híbridas, los antígenos individuales del híbrido (es decir, las fracciones individuales -X-) pueden ser de una o más cepas. Cuando $n = 2$, por ejemplo, X₂ puede ser de la misma cepa que X₁ o de una cepa diferente. Cuando $n=3$, las cepas podrían ser (i) X₁ = X₂ = X₃ (ii) X₁ = X₂ ≠ X₃ (iii) X₁ ≠ X₂ = X₃ (iv) X₁ ≠ X₂ ≠ X₃ (v) X₁ = X₃ ≠ X₂, etc.

El termino "alquilo" se refiere a grupos alquilo en ambas formas, lineal y ramificada. El grupo alquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos elegidos de entre -O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo también puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 dobles y/o triples enlaces. Sin embargo, el término "alquilo" se refiere habitualmente a grupos alquilo con ninguna interrupción por heteroátomos ni interrupciones por dobles o triples enlaces. Cuando se hace referencia a un alquilo C₁₋₁₂, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier numero de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). De forma similar, cuando se hace referencia a un alquilo C₁₋₆, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier numero de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

El termino "cicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, así como combinaciones de estos con grupos alquilo, tales como grupos cicloalquilalquilo. El grupo cicloalquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos elegidos de entre -O-, -NH- o -S-. Sin embargo, el término "cicloalquilo" se refiere habitualmente a grupos cicloalquilo sin ninguna interrupción por heteroátomos. Algunos ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilometilo y grupos adamantilo. Cuando se hace referencia a un cicloalquilo C₃₋₁₂, se entiende que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier numero de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

El termino "arilo" se refiere a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a un arilo C₅₋₁₂, se entiende que el grupo arilo puede contener cualquier numero de átomos de carbono entre 5 y 12 (por ejemplo, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

El termino "arilo C₅₋₁₂- alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos tales como bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

Los grupos protectores de nitrógeno incluyen grupos sililo (tales como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tales como ftalimidas, trifluoroacetamidas, metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, t-butoxycarbonilo (Boc), benciloxycarbonilo (Z o Cbz), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxycarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxycarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tales como [3-trimetilsililetansulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C₁₋₁₂, bencilo, benzhidrilo, tritilo, β-fenilfluorenilo etc. Un grupo protector de nitrógeno preferido es Fmoc.

Se apreciara que pueden existir anillos de azúcar en forma abierta y cerrada y que, mientras que las formas cerradas se muestran en las formulas estructurales de este documento, las formas abiertas también están englobadas por la invención.

Las secuencias incluidas para facilitar la clonación o la purificación, etc., no contribuyen necesariamente a la invención, y pueden omitirse o eliminarse.

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse mediante diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación a partir de un cultivo celular, síntesis química (al menos en parte), etc.) y de varias formas

(por ejemplo, natural, fusiones, no glucosilada, lipidada, etc.). Preferiblemente se preparan en una forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente exentos de cualquier otra proteína de *N. meningitidis* o de la célula hospedadora).

El ácido nucleico según la invención puede prepararse de muchas formas (por ejemplo, mediante síntesis química (al menos en parte), a partir de genotecas de ADN genómico o ADNc, a partir del propio organismo, etc.), y puede tener varias formas (por ejemplo, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas, etc.). Preferiblemente se prepara en una forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente exento de otros ácidos nucleicos de *N. meningitidis* o de la célula hospedadora). El término "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, Y también sus análogos, tales como los que contienen esqueletos modificados (por ejemplo, fosforotioatos, etc.), y también ácidos nucleicos peptídicos (*peptide nucleic acids*, PNA) etc. La invención incluye un ácido nucleico que comprende secuencias complementarias a las descritas anteriormente (por ejemplo, con propósitos antisentido o como sonda).

Después del serogrupo, la clasificación de los meningococos incluye el serotipo, el serosubtipo y después el inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera serogrupo, serotipo, serosubtipo, inmunotipo, separados cada uno por una coma, por ejemplo, B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes provocan a menudo enfermedades (hiperinvasivos), algunos linajes causan formas más graves de la enfermedad que otros (hipervirulentos), y otros raramente causan alguna enfermedad. Se han reconocido siete linajes hipervirulentos, a saber, los subgrupos I, III Y IV-1, el complejo ET-5, el complejo ET-37, el agregado A4 y el linaje 3. Estos se han definido mediante electroforesis enzimática multilocus (flee), pero también se ha usado el tipado de secuencia multilocus (*multi/locus sequence typing*, MLST) para clasificar a los meningococos [ref. 41].

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

1. Composiciones de sacáridos de meningococos para la administración intramuscular a seres humanos

Se prepararon conjugados de oligosacáridos de MenC, MenW135, MenY y, opcionalmente, de MenA, según se desvela en la referencia 7. Estos se usaron para preparar dosis individuales de 0,5 ml de las siguientes seis composiciones (cantidades por dosis de 0,5 ml):

Componente	A*	B	C*	D*	E*	F
Conjugado de oligosacárido de serogrupo A-CRM ₁₉₇ µg	10	0	10	5	2,5	0
Conjugado de oligosacárido de serogrupo C-CRM ₁₉₇ µg	10	10	5	5	2,5	10
Conjugado de oligosacárido de serogrupo W135-CRM ₁₉₇ µg	10	10	5	5	2,5	0
Conjugado de oligosacárido de serogrupo Y-CRM ₁₉₇ µg	10	10	5	5	2,5	0
Cuadrante de fosfato de aluminio mg	0,3					
Cloruro sódico mg	4,5					
Manitol mg	7,5					
Fosfato sódico monobásico (pH 7,6) mg	0,69					
Dihidrogenofosfato potásico mg	0,34					
Tween™ 80 mg	0,025					
* el componente del serogrupo A está en forma liofilizada y se diluyó con una composición líquida CWY para dar la composición final ACWY,						

Estas vacunas se administran mediante inyección intramuscular en la región del muslo de niños de 12-16 meses, bien en una única dosis (lo que es eficaz para Menjuqate™ en niños >12 meses) o bien, una segunda inyección 4 semanas después. Los BCA e IgG séricos pueden compararse antes y después de la vacunación (por ejemplo, a las 4 semanas, y después a las 8 semanas si se reciben dos dosis).

2. Composición en dos viales

Se prepararon conjugados para uso humano en dos viales individuales. El vial 1 contenía un polvo liofilizado de conjugado de MenA, con sacarosa y dihidrogenofosfato sódico. El vial 2 contenía los conjugados MenC, MenW135 y MenY, con cloruro sódico, polisorbato 80, tampón de fosfato sódico y un coadyuvante opcional de fosfato de 5 aluminio, que está presente en suspensión. Antes de su uso, el vial 1 es reconstituido con 0,6 ml de líquido del vial 2, para dar 0,5 ml disponibles para su administración.

Se prepararon tres dosis. En su forma reconstituida, las vacunas contenían los antígenos como sigue:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM ₁₉₇ ó 5 µg de sacárido + 6,25-16,5 µg de CRM ₁₉₇ ó 2,5 µg de sacárido + 3,125-8,25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM ₁₉₇ ó 5 µg de sacárido + 6,25-12,5 µg de CRM ₁₉₇ ó 2,5 µg de sacárido + 3,125-6,25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇ ó 5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇ ó 2,5 µg de sacárido + 1,65-5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇ ó 5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇ ó 2,5 µg de sacárido + 1,65-5 µg de CRM ₁₉₇

En su forma reconstituida, las vacunas contenían otros componentes como sigue:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Coadyuvante de fosfato de aluminio	0,3 mg como Al ⁺³ cero
Dihidrogenofosfato sódico	1 mM 2,5 mM
Hidrogenofosfato disódico dihidratado	9 mM 7,5 mM
Tampón de fosfato sódico	10 mM
Dihidrogenofosfato potásico	5 mM
Tween™ 80 (tensoactivo)	0,025 mg
Cloruro sódico (tonicidad)	4,5 mg
Sacarosa (lío-filización y tonicidad)	12,5 mg
Agua para inyección	Hasta el volumen final

Por lo tanto había disponibles seis vacunas - tres dosis diferentes (10, 20 ó 40 µg de sacárido total), cada una con o sin coadyuvante de fosfato de aluminio.

Se administró la vacuna con coadyuvante con la mayor dosis de sacárido a sujetos humanos sanos de entre 18-45 años. Para comparar, los sujetos de control recibieron bien (a) los productos del vial 1 (reconstituido con tampón) y del vial 2 en diferentes brazos al mismo tiempo, o bien (b) Mencevax™. Cada grupo de pacientes contiene 30 personas.

Se recogió sangre antes y 28 días después de la vacunación para evaluar la respuesta inmunitaria y para recoger parámetros de seguridad del laboratorio (recuento sanguíneo completo, análisis de bioquímica sanguínea, pruebas de función hepática y renal y análisis de orina). La vacuna era bien tolerada, sin ninguna reacción adversa inesperada. No se produjeron cambios anormales significativos en los parámetros de laboratorio durante el estudio.

Se determinaron los SBA e IgG específicos de los serogrupos A, C, W-135, Y (medidos mediante ELISA) en las 5 muestras séricas. Los títulos de SBA se expresaron como el recíproco de la dilución sérica final, dando ≥50% de destrucción a los 60 minutos. Para la medición de la IgG se realizó un ELISA modificado para ensayar los

anticuerpos de alta avidéz. Para la detección de anticuerpos funcionales se usaron SBAs con dos fuentes exógenas diferentes de complemento: una fuente de complemento de cría de conejo y una fuente de complemento humana.

Los resultados de la IgG de alta avidéz fueron como sigue (GMC medias ($\mu\text{g/mL}$) con intervalos de confianza del 95%):

Serogrupo	Suero	Grupo vacunal		
		ACWY	A+CWY	Mencevax™
A	Pre	0,67 (0,3-1,2)	0,85 (0,4-1,5)	0,45 (0,2-0,8)
	Post	10 (6,6-16)	14 (8,8-22)	9,8 (6,2-15)
C	Pre	0,21 (0,1-0,3)	0,13 (0,07-0,2)	0,16 (0,1-0,2)
	Post	7,7 (4,7-13)	5,2 (3,19-8,46)	8,5 (5,2-14)
W-135	Pre	0,21 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	0,29 (0,19-0,4)
	Post	12 (6,5-21)	9 (5,5-18)	6,7 (3,7-12)
Y	Pre	0,35 (0,2-0,5)	0,31 (0,1-0,5)	0,57 (0,3-0,9)
	Post	18 (12-29)	21 (13-33)	20 (12-31)

Los resultados de los SBA fueron como sigue (% de respondedores y GMT media, ambos con un IC del 95%):

Serogrupo	Grupo vacunal	SBA del complemento de conejo		SBA del complemento humano	
		Títulos $\geq 1:128$ (%)	GMT	Títulos $\geq 1:4$ (%)	GMT
A	ACWY	93 (78-99)	989 (558-1754)	90 (73-98)	42 (23-76)
	A + CWY	97 (83-100)	2566 (1448-4549)	97 (83-100)	66 (36-119)
	Mencevax	100 (88-100)	3132(1767-5552)	83 (65-94)	28 (15-50)
C	ACWY	97 (82-100)	4480 (2455-8176)	100 (88-100)	213 (106-427)
	A + CWY	100 (88-100)	3794 (2100-6855)	100 (88-100)	162 (80-325)
	Mencevax	93 (78-99)	3829 (2119-6918)	100 (88-100)	223 (111-448)
W-135	ACWY	10,0 (88-100)	10343 (5988-17865)	100 (88-100)	248 (123-500)
	A + CWY	100(88-100)	10376 (6007-17923)	93 (78-99)	142 (71-287)
	Mencevax	100 (88-100)	6795 (3934-11737)	97 (83-100)	99 (49-199)
Y	ACWY	100 (88-100)	22075 (14689-33175)	100 (88-100)	263 (151-457)
	A + CWY	100 (88-100)	24034 (15993-36120)	100 (88-100)	162 (194-588)
	Mencevax	100 (88-100)	14630 (9735-21987)	100 (88-100)	198 (114-344)

Para cada serogrupo y en cada grupo vacunal (ACWY, A + CWY y control de Mencevax), las GMCs de la IgG anti-capsular de alta avidéz mediante ELISA y la GMT de los SBA medidos con los ensayos de complemento de conejo y humano, aumentaron tras la inyección. En el día 29 tras la inyección de la vacuna, el porcentaje de sujetos con títulos de SBA de complemento humano $\geq 1:4$ para cada grupo variaba entre el 90%-100% en las vacunas conjugadas y entre el 83%-100% en el grupo de control. Usando la fuente de complemento de conejo, el porcentaje

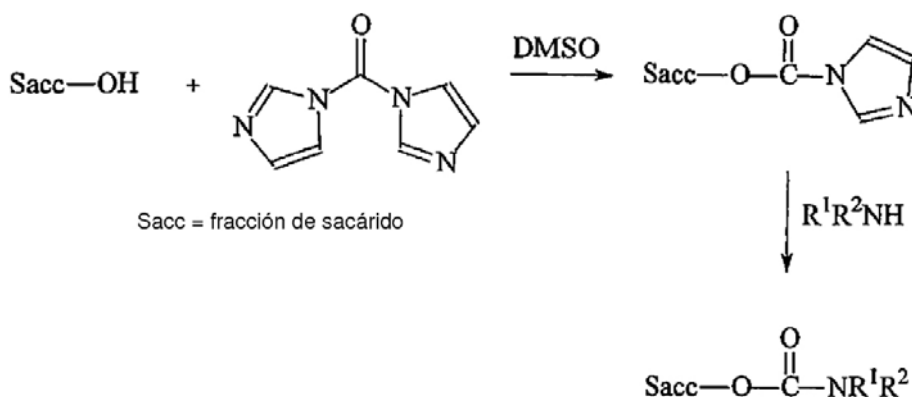
de sujetos con títulos de SBA $\geq 1:128$ para cada serogrupo variaba entre el 93%-100% para las vacunas conjugadas y entre el 90%-100% para el grupo de control.

Globalmente, las respuestas inmunitarias (GMC y GMT) eran mejores en los grupos con conjugados que en el grupo de control con Mencevax. La mejora se observó especialmente con el serogrupo W-135. Las vacunas conjugadas de la invención son por lo tanto seguras, bien toleradas e inducen respuestas inmunitarias funcionales iguales o mejores a las observadas tras la inmunización con una vacuna de polisacáridos tetravalente autorizada.

3. Uso de sacárido modificado de MenA

Se purificó el polisacárido de MenA y se hidrolizó para dar oligosacárido de MenA. El polisacárido (2 g) se hidrolizó a 50° C en tampón de acetato sódico 50 mM, pH 4,75, a una concentración de polisacárido de 10 mg/mL durante aproximadamente 4 horas [73]. Tras la hidrólisis la disolución se secó mediante evaporación rotatoria.

El oligosacárido se activó usando el siguiente esquema de reacción:



El oligosacárido se disolvió en DMSO para dar una concentración de sacárido de 10 mg/mL. Según una proporción molar de oligosacárido:CDI de 1:20, se añadieron después 21,262 g de CDI y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El compuesto resultante de MenA-CDI se purificó mediante una precipitación selectiva en una mezcla 80:20 (v/v) de acetona:DMSO seguido de una centrifugación. La eficacia de la reacción de activación se calculó en aproximadamente el 67,9% mediante la determinación de la proporción entre el imidazol libre y el imidazol unido.

En la segunda etapa de la reacción, se solubilizó el oligosacárido MenA-CDI en DMSO a una concentración de sacárido de aproximadamente 10 mg/mL. Según una proporción molar de unidad de MenA-CDI:DMA de 1:100, se añadieron 36,288 g de clorhidrato de dimetilamina al 99% (es decir, R^1 & R^2 = Me) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se liofilizó y se resolubilizó en una disolución de agua de 10 mg/mL.

Para eliminar el reactivo de bajo peso molecular de la reacción (en particular, la dimetilamina (DMA)) de la preparación de oligosacárido, se realizó una etapa de diálisis a través de una membrana de 3,5 kDa de MWCO (Spectra/Por™). Se llevaron a cabo cuatro etapas de diálisis: (i) 16 horas frente a 2 L de cloruro sódico 1 M (factor de diálisis 1:20), (ii) 16 horas frente a 2 L de cloruro sódico 0,5 M (factor de diálisis 1:20), (iii) y (iv) 16 horas frente a 2 L de WFI (factor de diálisis 1:20). Para mejorar la purificación también se llevó a cabo una etapa de diafiltración realizada a través de una membrana de 1 kDa de MWCO (Centricon™).

El producto purificado MenA-CDI-DMA se tamponó a pH 6,5 en L-histidina 25 mM (Fluka™).

Para preparar los conjugados del sacárido modificado de MenA (MenA-CDI-DMA), el proceso global fue como sigue:

- hidrólisis del polisacárido para dar fragmentos de oligosacárido
- dimensionamiento de los fragmentos de oligosacárido
- aminación reductora de los grupos aldehído terminales de los oligosacáridos dimensionados
- protección de los grupos -NH₂ terminales con un grupo Fmoc antes de la reacción con CDI

- desprotección intrínseca de los grupos -NH₂ durante la reacción con DMA
- activación de los grupos -NH₂-terminales con SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimida adípico)
- unión covalente a una proteína CRM₁₉₇.

El conjugado de oligosacárido de MenA modificado era mucho más resistente a la hidrólisis que su contrapartida natural a elevadas temperaturas. Por ejemplo, después de 28 días a 37° C, el porcentaje de sacárido liberado es del 6,4% para el oligosacárido modificado frente al 23,5% para el antígeno natural. Además, los títulos inducidos por los oligosacáridos modificados no son significativamente inferiores que los obtenidos usando las estructuras de los azúcares naturales.

El conjugado modificado de MenA se combina con conjugados de MenC, MenW135 y MenY como sustituto para el conjugado de oligosacárido no modificado.

4. Adición de antígenos de MenB

Antes de la reconstitución del conjugado liofilizado de MenA según se describió anteriormente, se añaden los antígenos de MenB ΔG287-953 (ID. SEC. NO: 7), 936-ΔG741 (ID. SEC. NO: 8) y NadA (ID. SEC. NO: 2) a la mezcla líquida de dosis más alta de C-W135-Y, para dar una concentración final de 20 µg/dosis para cada uno de los tres polipéptidos. La vacuna reconstituida contiene por tanto los siguientes antígenos:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
AG287-953	20 µg de polipéptido
936-A741	20 µg de polipéptido
NadA	20 µg de polipéptido

5. Adición de antígeno de Hib

El conjugado liofilizado de HbOC se mezcla con el conjugado liofilizado de MenA y ambos son reconstituidos conjuntamente mediante la mezcla líquida C-W135-Y para dar la siguiente vacuna:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del HbOC de Hib	10 µg de sacárido + 2-5 µg de CRM ₁₉₇

6. Adición de antígenos de neumococos

Antes de la reconstitución del conjugado liofilizado de MenA según se describió anteriormente, se añaden antígenos conjugados de neumococos a la mezcla líquida de dosis media C-W135-Y para dar una concentración final de 2 µg/dosis para cada uno de los serotipos (doble para el serotipo 6B). La vacuna reconstituida contiene por tanto los siguientes antígenos:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	5 µg de sacárido + 6,25-16,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	5 µg de sacárido + 6,25-12,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135	5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo 4 de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 9V de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 14 de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 18C de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 19F de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 23F de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 6B de <i>Pneumococcus</i>	4 µg de sacárido + 5 µg de CRM ₁₉₇

Se entenderá que la invención ha sido descrita a modo de ejemplo solamente y se pueden hacer modificaciones mientras se permanece dentro del ámbito de la invención, que se define en las reivindicaciones añadidas.

REFERENCIAS

- [1] Capítulo 28 de Vacunas (Plotkin & Orenstein) 3ª edición (1999) ISBN 0-7216-7443-7.
- [2] Armand y col. (1982) J. Biol. Stand. 10: 335-339.
- [3] Cadoz y col. (1985) Vaccine 3: 340-342.
- [4] MMWR (1997) 46 (RR-5) 1-10.
- [5] Baklaic y col. (1983) Infect. Immun. 42: 599-604.
- [6] Documento WO02/058737.
- [7] Documento WO03/007985.
- [8] Rennels y col. (2002) Pediatr Infect Dis J 21: 978-979.
- [9] Campbell y col. (2002) J Infect Dis 186: 1848-1851.
- [10] Costantino y col. (1992) Vaccine 10: 691-698.
- [11] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2: 47-49.
- [12] Documento WO02/00249.
- [13] Documento WO97/28273.
- [14] Lieberman y col. (1996) JAMA 275: 1499-1503.
- [15] Frash (1990) pags. 123-145 de Advances in Biotechnological Processes vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [16] Inzana (1987) Infect. Immun. 55: 1573-1579.
- [17] Kandil y col. (1997) Glycoconj J 14: 13-17.
- [18] Berkin y col. (2002) Chemistry 8: 4424-4433.
- [19] Documento WO03/080678.
- [20] Documento WO98/08543.
- [21] Tettelin y col. (2000) Science 287: 1809-1815.
- [22] Pizza y col. (2000) Science 287: 1816-1820.
- [23] Documento WO99/24578.
- [24] Documento WO99/36544.
- [25] Documento WO99/57280.
- [26] Documento WO00/22430.
- [27] Documento WO00/66791.
- [28] Documento WO00/66741.
- [29] Documento WO01/64920.
- [30] Documento WO01/64922.
- [31] Documento WO03/020756.
- [32] Solicitudes de patente del Reino Unido 0223741.0, 0305831.0 & 0309115.4, Y solicitud internacional PCT/IB03/04848.
- [33] Comanducci y col. (2002) J. Exp. Med. 195: 1445-1454.
- [34] Documento WO03/01 0194.
- [35] Parkhill y col. (2000) Nature 404: 502-506.
- [36] Solicitud de patente internacional PCT/IB03/06320.

- [37] Documento *WO03/063766*.
- [38] Massignani y col. (2003) *J Exp Med* 197: 789-799.
- [39] <http://1/neisseria.org/flm/typing/n:1st!>
- 5 [40] Pettersson y col. (1994) *Microb Pathog* 17(6): 395-408.
- [41] Maiden y col. (1998) *PNAS USA* 95: 3140-3145.
- [42] Welsch y col. (2002) Decimotercera Conferencia Internacional sobre Neisseria Pat6gena, Instituto Noruego de Salud Pública, Oslo, Noruega; 1-6 de septiembre de 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups Band C Neisseria meningitidis strains.
- 10 [43] Santos y col. (2002) Decimotercera Conferencia Internacional sobre Neisseria Pat6gena, Instituto Noruego de Salud Pública, Oslo, Noruega; 1-6 de septiembre de 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of *N. meningitidis*.
- [44] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2: S28-36.
- [45] Buttery & Moxon (2000) *J R Coil Physicians Lond* 34: 163-168.
- [46] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 113-33, vii.
- 15 [47] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47: 563-567.
- [48] Patente Europea 0477508.
- [49] Patente de EE.UU. 5.306.492.
- [50] Documento *WO98/42721*.
- 20 [51] Dick Ycol. en *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10: 48-114.
- [52] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [53] Kanra y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42: 421-427.
- [54] Ravenscroft y col. (2000) *Dev Bioi (Basel)* 103: 35-47.
- [55] Documento *WO97/00697*.
- 25 [56] Documento *WO96/37222*; Patente de EE.UU. 6.333.036.
- [57] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 331-332.
- [58] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269-285, v.
- [59] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Bioi Rev* 65: 187-207.
- [60] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68: 1435-1440.
- [61] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4: 609-630.
- 30 [62] Tettelin y col. (2001) *Science* 293: 498-506.
- [63] Hoskins y col (2001) *J Bacteriol* 183: 5709-5717.
- [64] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3: 445-450
- [65] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19: 2688-2691.
- [66] Massignani y col. (2002) *Expert Opin Bioi Ther* 2: 895-905.
- 35 [67] Mora y col. (2003) *Drug Discov Today* 8: 459-464.
- [68] Wizemann y col. (2001) *Infect Immun* 69: 1593-1598.
- [69] Rigden y col. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Bioi* 38: 143-168.
- [70] Documento *WO02/22167*.
- 40 [71] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
- [72] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17: 2802-2816.
- [73] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17: 1251-1263.
- [74] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357 (9251): 195-196.
- [75] An6nimo (enero de 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- 45 [76] Anderson (1983) *Infect Immun* 39 (1): 233-238.
- [77] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76 (1): 52-59.
- [78] Documento EP-A-0372501.
- [79] Documento EP-A-0378881.
- [80] Documento EP-A-0427347.
- 50 [81] Documento WO93/17712
- [82] Documento WO94/03208.
- [83] Documento WO98/58668.
- [84] Documento EP-A-0471177.
- [85] Documento WO91/01146
- 55 [86] Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31: 3816-3824.
- [87] Documento EP-A-0594610.
- [88] Documento WO00/56360.
- [89] Documento WO02/091998.
- [90] Documento WO01 /72337
- [91] Documento WO00/61761.
- 60 [92] Documento WO99/42130
- [93] Documento WO96/40242
- [94] Lees y col. (1996) *Vaccine* 14: 190-198.
- [95] Documento WO95/08348.
- [96] Patente de EE.UU. 4.882.317
- 65 [97] Patente de EE.UU. 4.695.624
- [98] Porro y col. (1985) *Mol Immunol* 22: 907-919.

- [99] Documento EP-A-0208375
- [100] Documento WO00/1 0599
- [101] Gever y col. Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- [102] Patente de EE.UU. 4.057.685.
- 5 [103] Patentes de EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [104] Patente de EE.UU. 4.459.286.
- [105] Patente de EE.UU. 4.965.338.
- [106] Patente de EE.UU. 4.663.160.
- [107] Patente de EE.UU. 4.761.283
- 10 [108] Patente de EE.UU. 4.356.170
- [109] Lei y col. (2000) Dev Bioi (Basel) 103: 259-264.
- [110] Documento WO00/38711; Patente de EE.UU. 6.146.902.
- [111] Documento WO03/009869.
- [112] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- 15 [113] Documento WO00/231 05.
- [114] Documento WO90/14837.
- [115] Patente de EE.UU. 5.057.540.
- [116] Documento WO96/33739.
- [117] Documento EP-A-01 09942.
- 20 [118] Documento WO96/11711.
- [119] Documento WO00/07621.
- [120] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32: 247-271.
- [121] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32: 321-338.
- [122] Niikura y col. (2002) Virology 293: 273-280.
- 25 [123] Lenz y col. (2001) J Immunol 166: 5346-5355.
- [124] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188: 327-338.
- [125] Gerber y col. (2001) Virol 75: 4752-4760.
- [126] Documento WO03/024480
- [127] Documento WO03/024481
- 30 [128] Gluck Ycol. (2002) Vaccine 20: B10-B16.
- [129] Documento EP-A-0689454.
- [130] Johnson y col. (1999) BioorgMed Chem Lett 9: 2273-2278.
- [131] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 219-229.
- [132] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21: 2485-2491.
- 35 [133] Pajak y col. (2003) Vaccine 21: 836-842.
- [134] Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31: 2393-2400.
- [135] Documento WO02/26757.
- [136] Documento WO99/62923.
- [137] Krieg (2003) Nature Medicine 9: 831-835.
- 40 [138] McCluskie y col. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32: 179-185.
- [139] Documento WO98/401 00.
- [140] Patente de EE.UU. 6.207.646.
- [141] Patente de EE.UU. 6.239.116.
- [142] Patente de EE.UU. 6.429.199.
- 45 [143] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (parte 3): 654-658.
- [144] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170: 4061-4068.
- [145] Krieg (2002) Trends Immunol 23: 64-65.
- [146] Documento WO01 /95935.
- [147] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306: 948-953.
- 50 [148] Bhagat y col. (2003) BBRC 300: 853-861.
- [149] Documento WO03/035836.
- [150] Documento WO95/17211.
- [151] Documento WO98/42375.
- [152] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70: 3012-3019.
- 55 [153] Pizza y col. (2001) Vaccine 19: 2534-2541.
- [154] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290: 455-461.
- [155] Scharton-Kersten y col. (2000) Infect Immun 68: 5306-5313.
- [156] Ryan y col. (1999) Infect Immun 67: 6270-6280.
- [157] Partidos y col. (1999) Immunol Lett 67: 209-216.
- 60 [158] Peppoloni y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 285-293.
- [159] Pine y col. (2002) J Control Release 85: 263-270.
- [160] Domenighini y col. (1995) Mol Microbiol 15: 1165-1167.
- [161] Documento WO99/40936.
- [162] Documento WO99/44636.
- 65 [163] Singh y col] (2001) J Cont Release 70: 267-276.
- [164] Documento WO99/27960.

- [165] Patente de EE.UU. 6.090.406
 [166] Patente de EE.UU. 5.916.588
 [167] Documento EP-A-0626169.
 [168] Documento WO99/52549.
 5 [169] Documento WO01/21207.
 [170] Documento WO01 /21152.
 [171] Andrianov y col. (1998) Biomaterials 19: 109-115.
 [172] Payne y col. (1998) Adv Drug Delivery Review 31: 185-196.
 [173] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27: 571-577.
 10 [174] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4: 214-218.
 [175] Documento WO99/11241.
 [176] Documento WO94/00153.
 [177] Documento WO98/57659.
 [178] Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 Y0761231.
 15 [179] Documento WO96/14086.
 [180] Vaccines (eds. Plotkin & Mortimer), 1988. ISBN: 0-7216-1946-0
 [181] Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334: 349-355.
 [182] Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9: 232-238.
 [183] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19: 1187-1188.
 20 [184] Iwarson (1995) APMIS 103: 321-326.
 [185] Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Supl.: S63-68 &79-80.
 [186] Documento WO93/24148.
 [187] Documento WO02/09643.
 [188] Katial y col. (2002) Infect Immun 70: 702-707.
 25 [189] Documento WO01 /52885.
 [190] Patente europea 0301992.
 [191] Bjune y col. (1991) Lancet 338 (8775): 1093-1096.
 [192] Fukasawa y col. (1999) Vaccine 17: 2951-2958.
 [193] Documento WO02/09746.
 30 [194] Rosenqvist y col. (1998) Dev. Biol. Stand. 92: 323-333.
 [195] Documento WO01 /09350.
 [196] Patente europea 0449958.
 [197] Documento EP-A-0996712.
 [198] Documento EP-A-0680512.
 35 [199] Documento WO02/062378.
 [200] Documento WO99/59625.
 [201] Patente de EE.UU. 6.180.111.
 [202] Documento WO01 /34642.
 [203] Documento WO03/051379.
 40 [204] Patente de EE.UU. 6.558.677
 [205] Documento PCT/IB03/04293.
 [206] Documento WO02/062380.
 [207] Documento WO00/25811.
 [208] Peeters y col. (1996) Vaccine 14: 1008-1015.
 45 [209] Vermont y col. (2003) Infect Immun 71: 1650-1655.
 [210] Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47: 287-308.
 [211] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59: 113-118, 125-126.
 [212] Charalambous & Feavers (2001) J Med Microbiol 50: 937-939.
 [213] Westerink (2001) Int Rev Immunol 20: 251-261.
 50 [214] Grothaus y col. (2000) Vaccine 18: 1253-1263.
 [215] Paoletti y col. (2001) Vaccine 19: 2118-2126.
 [216] Documento WO00/56365.
 [217] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th ed., ISBN: 0683306472
 [218] Documento WO01 /30390.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l.

60 <120> Vacunas de combinación de sacáridos inyectables

<130> P053819WO

<150> GB0302217.5

65 <151> 2003-01-30

<150> GB0323101.6
 <151> 2003-10-01

 5 <150> PCT/IB2004/000651
 <151> 2004-01-30

 <150> EP04706762.4
 <151> 2004-01-30

 10 <160> 12

 <170> SeqWin99, version 1.02

 <210> 1
 15 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

 20 <400> 1

 25 Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Thr
 1 5 10 15

 Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys
 30 20 25 30

 Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile
 35 35 40 45

 Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly
 50 55 60

 Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp
 40 65 70 75 80

 Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr
 85 90 95

 45 Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu
 100 105 110

 Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala
 50 115 120 125

 Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn
 130 135 140

 55 Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn
 145 150 155 160

 Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp
 60

 65

					165					170					175	
5	Lys	His	Ala	Glu	Ala	Phe	Asn	Asp	Ile	Ala	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Thr
				180					185					190		
10	Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Asn	Glu	Ala	Lys	Gln
			195					200					205			
	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala
		210					215					220				
15	Glu	Thr	Ala	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Asn	Thr
	225					230					235					240
20	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Asp	Ile	Lys
					245					250					255	
	Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys	Asp	Asn	Ile	Ala	Lys	Lys	Ala	Asn	Ser
				260					265					270		
25	Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Val	Arg	Ile
			275					280					285			
	Asp	Gly	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Leu	Asp	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser
		290					295					300				
30	Ala	Glu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp	His	Asp	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Asp
	305					310					315					320
35	Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Leu	Ala	Glu
					325					330					335	
	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly		
				340					345					350		
40	<210> 2 <211> 327 <212> PRT <213> Neisseria meningitidis															
45	<400> 2															
	Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Lys	Lys	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ile	Ala
	1				5					10					15	
50	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			
55	Thr	Ala	Ala	Asp	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Leu	Gly	Leu	Lys
	50						55					60				
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		
65	Thr	Lys	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala
				100					105					110		

5 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

10 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

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

20 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

25 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

30 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

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

40 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

45 <210> 3
<211> 248
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

50 <400> 3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
1 5 10 15

55 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

60 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
50 55 60

65

5 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
 10 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
 15 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
 20 Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His
 165 170 175
 25 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
 30 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
 35 His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 245
 <210> 4
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 4
 45 Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala Val
 1 5 10 15
 50 Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala Leu
 20 25 30
 Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr
 35 40 45
 55 Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asn Arg His Leu
 50 55 60
 60 Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly
 65 70 75 80
 Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile
 85 90 95
 65 Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr

	100	105	110
5	Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala 115 120 125		
	Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val 130 135 140		
10	Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val 145 150 155 160		
15	Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr 165 170 175		
	Val Gln Arg		
20	<210> 5 <211> 168 <212> PRT <213> Neisseria meningitidis		
25	<400> 5		
	Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile 1 5 10 15		
30	Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr 20 25 30		
	Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile 35 40 45		
35	Thr Ile Pro Ile Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp 50 55 60		
40	His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile 65 70 75 80		
	Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser 85 90 95		
45	Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu 100 105 110		
	Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Glu Lys Thr Glu 115 120 125		
50	Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly 130 135 140		
55	Met Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp 145 150 155 160		
	Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln 165		
60	<210> 6 <211> 464 <212> PRT <213> Neisseria meningitidis		
65	<400> 6		

ES 2 411 080 T3

	Ser	Pro	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Ala	Ala	Pro	
	1				5					10					15		
5	Val	Val	Ser	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Pro	Gln	Ala	
				20					25					30			
	Gly	Ser	Gln	Gly	Gln	Gly	Ala	Pro	Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Gln	Asp	Met	
10			35					40					45				
	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Val	Thr	Ala	
		50					55					60					
15	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn	Glu	Asp	Glu	Val	Ala	Gln	Asn	Asp	Met	Pro	Gln	
	65					70					75					80	
	Asn	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Pro	Asn	His	Thr	Pro	Asp	Pro	
20					85					90					95		
	Asn	Met	Leu	Ala	Gly	Asn	Met	Glu	Asn	Gln	Ala	Thr	Asp	Ala	Gly	Glu	
				100					105					110			
25	Ser	Ser	Gln	Pro	Ala	Asn	Gln	Pro	Asp	Met	Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Gly	
			115					120					125				
	Met	Gln	Gly	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Asn	Ala	Gly	Asn	Thr	
		130					135					140					
30	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Asn	Gln	Ala	Gly	Asn	Asn	Gln	Ala	Ala	Gly	Ser	
		145				150					155					160	
	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly	Ser	
35				165					170						175		
	Asn	Phe	Gly	Arg	Val	Asp	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	
			180					185					190				
40	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Cys	Ser	Gly	
		195						200					205				
	Asn	Asn	Phe	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Ser	Glu	Phe	Glu	Lys	
45		210					215					220					
	Leu	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys	Ile	Ser	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly	Lys	Asn	
		225				230				235						240	
50	Asp	Lys	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Asp	Ser	Val	Gln	Met	Lys	Gly	Ile	
				245					250					255			
	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Phe	Tyr	Lys	Pro	Lys	Pro	Thr	Ser	Phe	Ala	Arg	
			260					265						270			
55	Phe	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Met	Pro	
		275					280					285					
	Leu	Ile	Pro	Val	Asn	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Val	Asp	Gly	Glu	Ala	
60		290				295					300						
	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Ile	Phe	Ala	Pro	Glu	Gly	Asn	
		305				310				315						320	

Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr
 325 330 335
 5
 Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly
 340 345 350
 Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly
 355 360 365
 10
 Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly
 370 375 380
 Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met
 385 390 395 400
 15
 Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly
 405 410 415
 20
 Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly
 420 425 430
 Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp
 435 440 445
 25
 Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 450 455 460
 30
 <210> 7
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 7
 35
 Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 40
 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
 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
 50
 Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
 85 90 95
 55
 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
 60
 Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly
 130 135 140
 65

	Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala	145	150	155	160
5	Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser	165	170	175	
10	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	
15	Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe	210	215	220	
20	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	
25	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	
30	Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu	290	295	300	
35	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	
40	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	
45	Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala	370	375	380	
50	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	
55	Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val	420	425	430	
60	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	
65	Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys				

	465		470		475		480
5	Val Asp Glu Tyr	His 485	Ala Asn Ala Arg	Phe 490	Ala Ile Asp	His Phe Asn	
	Thr Ser Thr	Asn 500	Gly Gly Phe Tyr	Gly 505	Leu Thr Gly	Ser Val Glu	
10	Phe Asp Gln	Ala Lys Arg Asp	Gly 520	Lys Ile Asp	Ile Thr Ile	Pro Val	
	Ala Asn Leu	Gln Ser Gly Ser	Gln 535	His Phe Thr	Asp 540	His Leu Lys	Ser
15	Ala Asp Ile	Phe Asp Ala	Ala Gln Tyr	Pro Asp	Ile Arg Phe	Val Ser	
	Thr Lys Phe	Asn Phe Asn	Gly Lys Lys	Leu Val Ser	Val Asp Gly	Asn	
20	Leu Thr Met	His Gly Lys	Thr Ala Pro	Val Lys Leu	Lys Ala Glu	Lys	
25	Phe Asn Cys	Tyr Gln Ser Pro	Met 600	Ala Lys Thr	Glu Val Cys	Gly Gly	
	Asp Phe Ser	Thr Thr Ile	Asp Arg Thr	Lys Trp Gly	Val Asp Tyr	Leu	
30	Val Asn Val	Gly Met Thr	Lys Ser Val	Arg Ile Asp	Ile Gln Ile	Glu	
	Ala Ala Lys	Gln					
35							
	<210> 8						
	<211> 434						
	<212> PRT						
40	<213> Neisseria meningitidis						
	<400> 8						
45	Met Val Ser	Ala Val Ile	Gly Ser Ala	Ala Val Gly	Ala Lys Ser	Ala	
	Val Asp Arg	Arg Thr Thr	Gly Ala Gln	Thr Asp Asp	Asn Val Met	Ala	
50	Leu Arg Ile	Glu Thr Thr	Ala Arg Ser	Tyr Leu Arg	Gln Asn Asn	Gln	
	Thr Lys Gly	Tyr Thr Pro	Gln Ile Ser	Val Val Gly	Tyr Asn Arg	His	
55	Leu Leu Leu	Leu Gly Gln	Val Ala Thr	Glu Gly Glu	Lys Gln Phe	Val	
	Gly Gln Ile	Ala Arg Ser	Glu Gln Ala	Ala Glu Gly	Val Tyr Asn	Tyr	
60	Ile Thr Val	Ala Ser Leu	Pro Arg Thr	Ala Gly Asp	Ile Ala Gly	Asp	
65							

	Thr	Trp	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	
			115					120					125				
5	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Val	Lys	Ile	Val	Thr	Tyr	Gly	Asn	Val	Thr	Tyr	
		130					135					140					
10	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		
15	Tyr	Val	Gln	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly	
				180					185						190		
20	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					
25	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		
30	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	
35			275					280					285				
	Gln	Thr	Glu	Gln	Ile	Gln	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Gly	Lys	Met	Val	Ala	
		290					295					300					
40	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		
45	Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Asp	Phe	Ala	
				340					345					350			
50	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					
55	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	
60					405					410					415		
	Ala	Glu	Val	Lys	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala	
				420					425					430			

<210> 9

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 5
 <400> 9

10
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 10
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 15
 <400> 10

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

65

ES 2 411 080 T3

	225		230		235		240
5	Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln	245		250		255	
	<210> 11						
	<211> 254						
	<212> PRT						
10	<213> Neisseria meningitidis						
	<400> 11						
15	Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu	1	5	10	15		
	Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln	20	25	30			
20	Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu	35	40	45			
	Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn	50	55	60			
25	Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg	65	70	75	80		
30	Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe	85	90	95			
	Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu	100	105	110			
35	Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser	115	120	125			
40	Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu	130	135	140			
	Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp	145	150	155	160		
45	Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly	165	170	175			
	His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu	180	185	190			
50	Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu	195	200	205			
55	Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala	210	215	220			
	Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys	225	230	235	240		
60	Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln	245	250				
65	<210> 12						
	<211> 262						
	<212> PRT						

<213> Neisseria meningitidis

<400> 12

5
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
1 5 10 15
10
Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys
20 25 30
Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn
35 40 45
15
Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala
50 55 60
20
Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
65 70 75 80
Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr
85 90 95
25
Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asn His Ser
100 105 110
Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Thr
115 120 125
30
Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly
130 135 140
35
Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu Tyr His
145 150 155 160
Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser
165 170 175
40
Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys
180 185 190
Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp
195 200 205
45
Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu
210 215 220
50
Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu
225 230 235 240
Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile
245 250 255
55
Gly Ile Ala Gly Lys Gln
260
60
65

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición inmunógena inyectable que comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de la *Neisseria meningitidis*, en donde (i) dichos sacáridos capsulares están conjugados de forma separada a una proteína portadora con un grupo de enlace y después mezcladas; (ii) los conjugados tienen una proporción sacárido:proteína (p/p) con exceso de proteína; y (iii) la composición comprende al menos 10 µg y ≤ 25 µg de sacárido capsular meningococo por dosis.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde dentro de cada dosis los antígenos sacáridos del serogrupo individual A, C, W135 e Y tienen una proporción de peso de 1:1:1:1 ó 2:1:1:1.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sacárido capsular del serogrupo A está modificado para reemplazar uno o más grupos hidroxilo con grupos de bloqueo.
- 15 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un antígeno no meningococo, no neisserial.
- 20 5. La composición de la reivindicación 4, en donde el antígeno es de neumococo, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, *B. pertussis* difteria, tétano, polio y/o *H.influenzae*.
6. La composición de las reivindicaciones 1-3, comprendiendo además un antígeno de proteína meningococo.
- 25 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los sacáridos capsulares en la composición son oligosacáridos.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además un coadyuvante de sal de aluminio.
- 30 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el uso en elevar una respuesta inmune en un paciente.
- 35 10. El uso de sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de la *Neisseria meningitidis* en la fabricación de un medicamento de composición inmunógena inyectable para elevar una respuesta inmune protectora contra la enfermedad del meningococo en un paciente, en donde: (i) dichos sacáridos capsulares están conjugados de forma separada a una proteína portadora con un grupo de enlace y después mezcladas; (ii) los conjugados tienen una proporción sacárido:proteína (p/p) con exceso de proteína; y (iii) la composición comprende al menos 10 µg y ≤ 25 µg de sacárido capsular meningococo por dosis.
- 40 11. El uso de la reivindicación 10, en donde el medicamento es una composición de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

45

50

55

60

65