



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 114**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05745670 .9**

96 Fecha de presentación : **11.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1748791**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2007**

54

Título: **Lipooligosacáridos de *Neisseria meningitidis* lgtB como adyuvante.**

30

Prioridad: **11.05.2004 EP 04076401**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.08.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.08.2010

73

Titular/es: **De Staat der Nederlanden, vert. door de
minister van VWS
P.O. Box 20350
2500 EJ The Hague, NL**

72

Inventor/es: **Steeghs, Liana, Juliana, Josephine;
Van de Winkel, Johannes, Gerardus, Joseph y
Van der Ley, Peter, André**

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 344 114 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

Lipooligosacáridos de *Neisseria meningitidis* lgtB como adyuvante.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a Lipo-oligo-sacáridos (LOS) Neisseriales que han aumentado la actividad inmunoestimuladora. Los LOS's Neisseriales de la invención comprenden un núcleo externo de trisacárido que muestra unión aumentada a un receptor en células dendríticas. El núcleo externo de trisacárido de los LOS's Neisseriales combinado con una fracción del Lípido A con toxicidad reducida es útil como un adyuvante en preparaciones de vacunas.

Antecedentes de la invención

15 LPS *Neisserial meningitidis* ha recibido atención como un candidato de vacuna potencial debido a su capacidad para inducir respuestas inmunitarias específicas del LPS al igual que es un adyuvante potente. No obstante, la actividad endotóxica del LPS ha limitado su uso en vacunas hasta el momento.

LPS meningocócico está compuesto de una parte del lípido A hidrofóbico que lo ancla a la membrana bacteriana externa y un núcleo del oligosacárido hidrofílico, que se expone a la superficie bacteriana (Figura 1). La inclusión de la cadena del oligosacárido nativo en preparaciones de vacuna es desaconsejable debido a su similitud estructural con los antígenos glicolipídicos del huésped. La ingeniería genética de las rutas de la biosíntesis del oligosacárido del LPS ha permitido la producción de series de mutantes de *N. meningitidis* que expresan cadenas de oligosacáridos truncadas (Figura 1). Las propiedades endotóxicas y adyuvantes del LPS resultan ser determinadas por la parte del lípido A de la molécula. Hemos generado previamente un único conjunto de mutantes del lípido A de *N. meningitidis* con propiedades farmacológicas altamente mejoradas. En particular, la inactivación del gen *lpxL1(htrB1)* implicado en la aciloxiacilación del lípido A resultó en el aislamiento de un mutante del lípido A que expresa el lípido A penta-acilado en vez de hexa-acilado, con actividad endotóxica reducida de adyuvante aunque retenida. Además, un mutante de *N. meningitidis* completamente carente de LPS debido a la inactivación del gen *lpxA* meningocócico fue aislado. Así, la modificación de la parte del lípido A al igual que la parte del oligosacárido de LPS meningocócico ha abierto posibilidades nuevas para el desarrollo de vacunas meningocócicas.

Las células dendríticas (DC) han llegado a ser de mayor interés debido a su papel en la iniciación de una respuesta inmunitaria tanto durante la infección natural como en la respuesta a la vacunación. Respuestas inmunitarias a bacterias se inician por DC, que fagocitan y procesan antígenos bacterianos para presentación a células T. Hemos mostrado recientemente que LPS de *N. meningitidis* juega un papel más importante durante las interacciones con DC humanas. Por otra parte se requiere LPS para la internalización de las bacterias y la activación completa de las DC.

WO2004/14417 expone preparaciones de ampollas Neisseriales derivadas de cepas de lgtB⁻ Neisseriales. NL-A-9 101 359 expone el uso del LPS de lgtB⁻ Neisseirial en conjugación con un péptido. WO 00/26384, van der Ley *et al.* 40 van der Ley *et al.*, 2001, Infect. Immun. 69: 5981-5990, y Steeghs *et al.*, 2004, J. Endotoxin Res. 10: 113-119 todos revelan moléculas de LPS Neisseriales con una fracción de lípido A modificada con una actividad de adyuvante de toxicidad reducida aunque retenida.

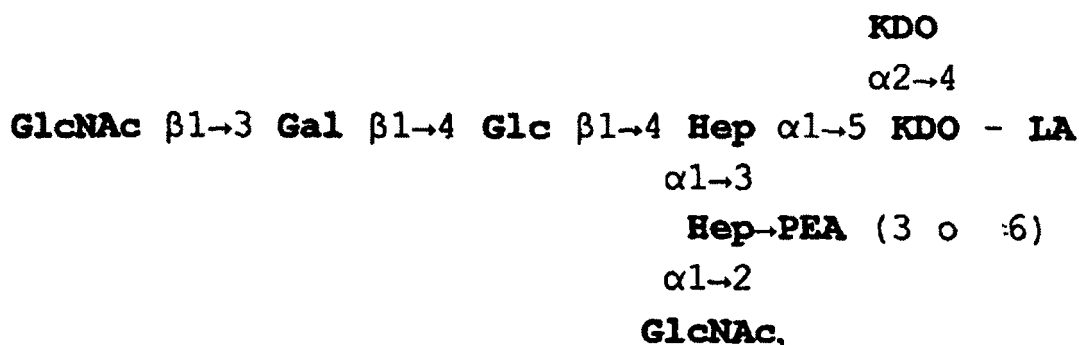
Descripción de la invención45 *Definiciones*

Los adyuvantes se definen en la presente incluyendo cualquier sustancia o compuesto que, cuando se usa en combinación con un antígeno, para inmunizar un mamífero, preferiblemente un humano, estimula el sistema inmunitario, de ese modo provocando, mejorando o facilitando la respuesta inmunitaria contra el antígeno, preferiblemente sin generar una respuesta inmunitaria específica al adyuvante mismo. Los adyuvantes preferidos incrementan la respuesta inmunitaria contra un antígeno dado al menos por un factor de 1.5, 2, 2.5, 5, 10 o 20, en comparación con la respuesta inmunitaria generada contra el antígeno bajo las mismas condiciones pero en ausencia del adyuvante. Pruebas para determinar la mejora del promedio estadístico de la respuesta inmunitaria contra un antígeno dado como es producido por un adyuvante en un grupo de animales o seres humanos sobre un grupo de control correspondiente están disponibles en la técnica. El adyuvante es preferiblemente capaz de aumentar la respuesta inmunitaria contra al menos dos antígenos diferentes. El adyuvante de la invención usualmente será un compuesto que es foráneo a un mamífero, de ese modo excluyendo compuestos inmunoestimuladores que son endógenos a los mamíferos, tales como p. ej. interleuquinas, interferones y otras hormonas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que un LPS Neisserial con una estructura de núcleo externo de trisacárido particular, muestra unión aumentada e internalización por células humanas dendríticas (DC's). La unión e internalización del LPS que contiene trisacáridos, o más bien LOS (lipooligosacárido) conteniendo trisacáridos, se media por DC-SIGN de la lectina tipo C que se expresa en DC's humanas y resulta en activación y maduración de la DC a un nivel aumentado. La actividad inmunoestimuladora mejorada de este nuevo LOS conteniendo trisacáridos Neisseriales permite su uso como un adyuvante potente en inmunización y vacunación.

Por tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a un método para inmunización o vacunación de un mamífero con un antígeno, el método comprendiendo la administración (al mamífero) del antígeno y un LOS Neisserial se representa por la fórmula (I):



en la cual LA es una fracción de lípido A tipo salvaje, preferiblemente de una cepa de *Neisseria*, o más preferiblemente una fracción de lípido A con toxicidad reducida.

En la fórmula (1), GlcNAc define D-glucosamina; Gal define D-galactosa; Glc define D-glucosa; Hep define D-heptosa; KDO define ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico; PEA define fosfo-etanolamina; $\beta 1 \rightarrow 4$ define un enlace β -glicosídico entre las primera y cuarta posiciones; $\beta 1 \rightarrow 3$ define un enlace β -glicosídico entre las primera y tercera posiciones; define un enlace α -glicosídico entre las primera y quinta posiciones; $\alpha 1 \rightarrow 3$ define un enlace α -glicosídico entre la primera y tercera posiciones; $\alpha 1 \rightarrow 2$ define un enlace α -glicosídico entre las primera y segunda posiciones; $\alpha 2 \rightarrow 4$ define un enlace α -glicosídico entre las segunda y cuarta posiciones; PEA(3 o 6) indica que la fosfo-etanolamina se puede enlazar a bien la tercera o sexta posición de la heptosa o puede estar ausente completamente.

La invención así se refiere al uso de un LOS Neisserial tal como se ha definido anteriormente en la producción de un medicamento para inmunización o vacunación de un mamífero. Preferiblemente el LOS Neisserial de la invención se usa como un adyuvante. Más preferiblemente, el LOS Neisserial se usa en combinación con un antígeno en la producción de un medicamento para aumentar una respuesta inmunitaria contra (o vacunación con) el antígeno en el mamífero.

En los métodos y usos de la invención, el mamífero es preferiblemente un humano. El antígeno es preferiblemente un antígeno de o producido por una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, una célula cancerosa o un alérgeno como se define adicionalmente más abajo. El antígeno y LOS Neisserial son preferiblemente usados en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa provocada por la bacteria, virus, hongo, o parásito, o el tumor provocado por la célula cancerosa, o la alergia provocada por el alérgeno.

En formas de realización preferidas de la invención, el LOS Neisserial de la invención tiene una fracción de lípido A (LA) modificada con toxicidad reducida. La toxicidad del LA modificado preferiblemente es inferior a la toxicidad de un LA tipo salvaje correspondiente, más preferiblemente el LA modificado es inferior a 90, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 o 0.2% de la toxicidad del LA de tipo salvaje. Las toxicidades de tipo salvaje y diferentes LA's modificados con toxicidad reducida se puede determinar en cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. Un ensayo preferido para determinar la toxicidad, es decir la actividad biológica de los LA's o LOS's Neisseriales de la invención es la prueba WEHI para la inducción de TNF-alfa en la línea celular macrófaga de MM6 (Espevik y Niessen, 1986, J. Immunol. Methods 95: 99-105; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988, Int. J. Cancer 41: 456-461).

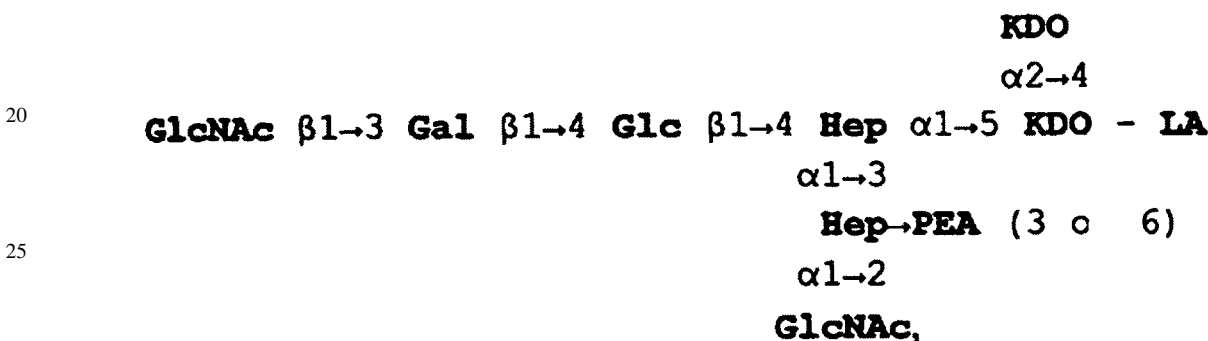
Por otro lado, el LOS Neisserial de la invención con un LA con toxicidad reducida debería tener todavía actividad inmunoestimuladora suficiente, es decir, actividad de adyuvante. El LOS Neisserial de la invención con toxicidad reducida preferiblemente tiene al menos 10, 20, 40, 80, 90 o 100% de la actividad inmunoestimuladora del LOS Neisserial correspondiente con un LA tipo salvaje, en el cual la actividad inmunoestimuladora es determinada midiendo la producción de al menos una citoquina o la expresión de al menos una molécula coestimuladora como se describe en el Ejemplo 3 aquí.

LOS's Neisseriales con toxicidad reducida de la fracción de lípido A pero reteniendo (parte de) la actividad del adyuvante, pueden p. ej. ser obtenidos de patógenos Gram negativos genéticamente modificados y como está revisado en WO02/09746. En particular, LOS's Neisseriales preferidos con LA's con toxicidad reducida incluyen: (a) LOS's con una fracción de lípido A como es obtenible de una cepa de *Neisseria* con una mutación que causa una reducción o inactivación de la expresión de uno o más de los genes *lpxL1* y *lpxL2* (anteriormente conocidos como genes *htrB* y *msbB*) u homólogos de los mismos (véase p. ej. EP 1 127 137; US 5,997,881); (b) LOS's con una fracción de lípido A como es obtenible por eliminación de uno o más ácidos grasos esterificados secundarios O-enlazados de una fracción de lípido A tipo salvaje por tratamiento con una aciloxihidrolasa o hidrólisis alcalina (US 5,103,661; Erwin *et al.*, 1991, Infect. Immun. 59: 1881-87); (c) LOS's con una fracción de lípido A como obtenible por tratamiento de

hidracina de una fracción de lípido A de tipo salvaje (Gu *et al.*, 1996, infect. Immun. 64: 4047-53; Polotsky *et al.*, 1994, Infect. Immun. 62: 210-14; Gu *et al.*, 1998, Infect. Immun. 66:1891-97, 1998); (d) LOS's con una fracción de lípido A como obtenible por desfosforilación de una fracción de lípido A con una fosfatasa alcalina (US 6,290,952); y, (e) LOS's obtenible por desfosforilación enzimática o desacilación de LOS producido en huésped *Neisseria* en el que un gen heterólogo *lpxE* o *pagL* es expresado. En la presente, expresión reducida se entiende que se refiere a aumentada o reducida cuando se compara con una cepa de tipo salvaje correspondiente, por la cual el nivel de expresión preferiblemente al menos difiere de un factor 2, 5 o 10 de la cepa correspondiente de tipo salvaje.

LA's preferidos con toxicidad reducida incluyen por tanto LA con un C₁₂-acilo secundario sólo en la glucosamina reductora, LA con un C₁₂-acilo secundario sólo en la glucosamina no reducida, LA carente de ambos grupos C₁₂-acilo secundarios, LA's carentes de uno o más grupos fosfato de bien la posición 1 o 4' y combinaciones de las desacilaciones y defosforilaciones mencionadas.

En otro aspecto la descripción se refiere a un LOS *Neisseria* que se representa por la fórmula (I):



en la cual preferiblemente LA es una fracción de lípido A con toxicidad reducida tal como se ha definido anteriormente.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende un LOS *Neisseria* como se ha definido aquí más arriba, un portador farmacéuticamente aceptable, y un antígeno que proviene de o es producido por una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, una célula cancerosa o un alérgeno. Las composiciones farmacéuticas pueden además comprender agentes aceptables farmacéuticamente estabilizantes, agentes osmóticos, agentes tampoadores, agentes de dispersión, y similares. La forma preferida de la composición farmacéutica depende del modo previsto de administración y del uso terapéutico. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible no tóxica adecuada para entregar los ingredientes activos, es decir el LOS *Neisseria* y el antígeno, al paciente. Portadores aceptables farmacéuticamente para entrega intranasal se ejemplifican por agua, soluciones salinas tamponadas, glicerina, polisorbato 20, cremophor EL, y una mezcla acuosa de glicérido caprílico/cáprico, y se pueden tamponar para proporcionar un entorno de pH neutro. Portadores aceptables farmacéuticamente para entrega parenteral se ejemplifican por 0,9% de NaCl estéril tamponado o 5% de glucosa opcionalmente suplementada con un 20% de albúmina. Preparaciones para administración parental deben ser estériles. La vía parental para administración de los ingredientes activos es acorde con métodos conocidos, p. ej. inyección o infusión por vías subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional. Las composiciones de la invención son preferiblemente administradas por inyección en bolo. Una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular sería compuesta para contener, por ejemplo, 1-10 ml de suero salino tamponado con fosfato y 1 a 100 µg, preferiblemente 15-45 µg de antígeno y 1 a 100 µg, preferiblemente 15-45 µg del LOS *Neisseria* de la invención. Para administración oral, la sustancia activa se puede administrar en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes, y suspensiones. Formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorante y aromatizante para aumentar la aceptación del paciente. Métodos para preparar composiciones administrables parenteralmente, oralmente o intranasalmente se conocen bien en la técnica y se describen en más detalle en diferentes fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

El antígeno en la composición de la invención es preferiblemente un antígeno que proviene de o es producido por una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, una célula cancerosa o un alérgeno. Antígenos víricos que se pueden combinar con el LOS *Neisseria* de la invención se pueden derivar de toda clase de virus, ejemplos no limitativos de estos virus son: Retroviridae tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); un rubellavirus; paramyxoviridae tal como el virus de parainfluenza, sarampión, paperas, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus humano; flaviviridae tal como virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la hepatitis C (HCV), virus de encefalitis japonesa (JEV), encefalitis transmitida por garrapatas, encefalitis de St. Louis o virus del Nilo del Oeste; Herpesviridae tal como virus herpes simplex, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr; Bunyaviridae; Arenaviridae; Hantaviridae tal como Hantaan; Coronaviridae; Papovaviridae tal como Papillomavirus humano; Rhabdoviridae tal como virus de la rabia. Coronaviridae tal como humano coronavirus; Alfaviridae, Arteriviridae, filoviridae tal como Ebolavirus, Arenaviridae, poxviridae tal como virus del botulismo, y virus de la fiebre porcina Africana. Asimismo los LOS's *Neisseriales* de la invención se pueden combinar con antígenos derivados de bacterias patógenas, hongos (incluyendo levaduras),

o parásitos. Antígenos de este tipo incluyen antígenos bacterianos de p. ej. *Helicobacter*, tal como *H. pylori*, *Neisseria*, tal como *N. meningitidis*, *Haemophilus*, tal como *H. influenza*, *Bordetella*, tal como *B. pertussis*, *Chlamydia*, *Streptococcus*, tal como *Streptococcus sp.* serotipo A, *Vibrio*, tal como *V. cholera*, patógenos gram-negativos entéricos incluyendo p. ej. *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Escherichia*, al igual que antígeno de bacterias causantes del

5 ántrax, lepra, tuberculosis, difteria, enfermedad de Lyme, sífilis, fiebre tifoidea, y gonorrea. Antígenos de parásitos p. ej. incluyen antígenos de protozoos, tal como *Babesiosis bovis*, *Plasmodium*, *Leishmania spp.* *Toxoplasma gondii*, y *Trypanosoma*, tal como *T. cruzi*. Antígenos fúngicos pueden incluir antígenos de hongos tales como *Aspergillus sp.*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, tal como p. ej. *C. neoformans*, y *Histoplasma capsulatum*.

10 Aunque la vacunación es generalmente aplicada para la protección profiláctica contra patógenos o para el tratamiento de enfermedades después de una infección patógena, el experto en la materia es consciente de la aplicación de vacunas para el tratamiento de tumores. Por otra parte, un número en aumento de proteínas específicas de tumores resultan ser entidades apropiadas que pueden ser enfocadas por anticuerpos humanos o humanizados. Estas proteínas específicas de tumores están también dentro del campo de la presente invención. Muchos antígenos tumorales

15 específicos son conocidos en la técnica. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la invención proporciona composiciones que comprenden un antígeno específico de tumores y un LOS Neisserial tal como se ha definido anteriormente. Antígenos tumorales adecuados incluyen p. ej. antígeno carcinoembrionario, antígeno de membrana específico de la próstata, antígeno específico de la próstata, proteína MZ2-E, mucina epitelial polimórfica (PEM), proteína de unión a folato LK26, receptor epidérmico (truncado) del factor de crecimiento (EGFR), HER2, antígeno

20 de Thomsen-Friedenreich (T), gangliósidos GM-2 y GD-2, Ep-CAM, mucina-1, glicoproteína-2 epitelial, y antígeno específico de colon.

Además, antígenos pueden ser previstos para DC's para inducir la tolerancia en la prevención de enfermedad auto-inmunitaria. Alérgenos de este tipo están también dentro del campo de la presente invención.

25 En otro aspecto la descripción se refiere a métodos para producir un LOS Neisserial tal como se ha definido anteriormente. Un método preferido comprende las fases de: (a) cultivar una cepa de *N. meningitidis*, donde la cepa expresa un LOS Neisserial de inmunotipo L2, L3 o L4 y carece de un gen *lgtB* activo, o expresa un LOS Neisserial de inmunotipo L6, y donde la cepa lleva una mutación que inactiva o reduce la expresión de uno o más de los genes *lpxL1* y *lpxL2*; y, (b) recuperación del LOS Neisserial. De forma alternativa, el método que incluye las etapas de: (a)

30 cultivar una cepa de *N. meningitidis*, donde la cepa expresa un LOS Neisserial de inmunotipo L2, L3 o L4 y carece de un gen *lgtB* activo, o expresa un LOS Neisserial de inmunotipo L6; (b) recuperar el LOS Neisserial; y, (c) tratar el LOS Neisserial con al menos uno de hidracina, una fosfatasa alcalina o aciloxihidrolasa para reducir la toxicidad de la fracción de lípido A. En el método, el orden de las fases (b) y (c) puede ser cambiado. En un método preferido,

35 en la fase c) la toxicidad se reduce hasta menos del 80% de la toxicidad del LOS Neisserial tipo salvaje, según es determinado en un ensayo WEHI como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto adicional la descripción se refiere a OMV's (vesículas de la membrana externa) o ampollas gram-negativas que comprenden los LOS's Neisseriales tal como se ha definido anteriormente. Medios y métodos para

40 producir OMV's o ampollas gram-negativas están descritos en WO 02/09746. Ampollas gram-negativas obtenidas de este modo se pueden combinar con el LOS Neisserial de la invención para producir ampollas gram-negativas que comprenden los LOS's Neisseriales. De forma alternativa las ampollas se pueden producir de una cepa Neisserial tal como se ha definido anteriormente, que es capaz de producir un LOS Neisserial de la invención. Las ampollas gram-negativas que comprenden pueden además ser combinadas con un antígeno como se ha descrito anteriormente y/o con

45 portadores aceptables farmacéuticamente como se ha descrito anteriormente.

Descripción de las figuras

50 Figura 1: Representación esquemática del LPS tipo salvaje L3 de *N. meningitidis* y sus mutantes oligosacáridos que se pueden generar por inactivación insercional de los genes (indicado en cursiva) que codifican las glicosiltransferasas.

Figura 2: células dendríticas (DC) fueron cultivadas con bacterias marcadas con FITC a una proporción de 1:50 durante 24 h. En los puntos temporales indicados, se tomaron muestras para medir la asociación de las bacterias a

55 DC'S por FACS. Un representativo de tres experimentos separados de tres donantes diferentes está mostrado.

Figura 3: DCs fueron estimuladas con bacterias marcadas con FITC a una proporción de 1:50 durante 18 h en presencia de brefeldina A y luego teñidas para TNF- α y IL-12 intracelular. Los diagramas de puntos muestran el porcentaje de DC asociadas a bacterias no productoras (cuadrante derecho inferior) o productoras (cuadrante derecho

60 superior) de citoquinas intracelulares.

Figura 4: producción de TNF- α , IL-12; IL-1 β , IL-10 y IL-6 por DC en respuesta al tipo salvaje de *N. meningitidis* y mutantes fueron medidos en sobrenadantes de cultivo por ELISA después de 18 h de cocultivo. Una media y SEM de tres experimentos separados están mostrados.

Figura 5: expresión de CD40 y CD86 después de 18h de cocultivo del tipo salvaje de *N. meningitidis* y mutantes con DCs como se indica por intensidad de fluorescencia mediana (MFI).

Figura 6: Unión de moléculas de Fc de lectina de tipo C para el tipo salvaje de *N. meningitidis* y mutantes en un ensayo de adhesión soluble.

Figura 7: asociación de DC del tipo salvaje de *N. meningitidis* y mutante de *lgtB* en presencia y ausencia de anticuerpos anti-DC-SIGN AZN-D1 de 20 microgramos por ml.

Figura 8: proliferación de células Th1/Th2 conducida por DC:

DC fueron incubadas con H44/76 tipo salvaje de *N. meningitidis*, el mutante de *lgtB*, LPS de *E. coli*, poli I:C o PGE2 durante 48 h, lavadas y (a) analizadas para marcadores de maduración (media y SEM de tres experimentos separados) o (b) cocultivadas con células T de CD45RA⁺ CD4⁺ altamente purificadas. Células T inertes fueron re-estimuladas con PMA e ionomicina, y IL-4 (gris) y IFN- γ (negro) intracelular fue analizado en una base de célula individual por citometría de flujo. Los datos de tres donantes diferentes están mostrados.

Figura 9: asociación de DC e inducción de citoquina de bacterias vivas.

Células dendríticas (DC) fueron cultivadas con *N. meningitidis* tipo salvaje marcada con FITC y mutantes de LPS a una proporción de 1:100. En los puntos temporales indicados, se tomaron muestras para medir la asociación de las bacterias a DCs por FACS. Los resultados se muestran con células de dos donantes diferentes.

Ejemplos

1. Materiales y métodos

1.1 Cepas bacterianas

El núcleo del oligosacárido y los mutantes del lípido A fueron derivados del tipo salvaje (WT) grupo B de *N. meningitidis* H44/76 y han sido descritos previamente:

Cepa o mutante	Referencia
H44/76	Holten, 1979, J.Clin.Microbiol. 9: 186-188
<i>galE</i>	Jennings et al., 1993, Mol.Microbiol. 10: 361-369
<i>lgtB</i>	Jennings et Al., 1995, Mol.Microbiol. 18: 729-740
<i>lpxL1</i>	van der Ley et al., 2001, Infect-Immun. 69:5981-5990

Estructura de los mutantes del núcleo del oligosacárido usados en este estudio se muestran en la figura 1. Todas las cepas fueron crecidas en agar gonocócico (Difco, Basingstoke, UK) suplementado con Vitox (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) en una atmósfera del 6% de CO₂ en aire a 36°C. Las bacterias fueron usadas en fase estacionaria después del cultivo durante 18 horas. Suspensiones de bacterias fueron preparadas en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Gibco, Paisley, UK), y su densidad óptica fue medida a 540 nm. La densidad óptica de 1 fue calculada para corresponder a 10⁹ organismos/ml. Las bacterias fueron fijadas en 0,5% de paraformaldehído (PFA) en suero salino tamponado con fosfato (PBS) durante 15 minutos y lavadas íntegramente en medio RPMI. Bacterias marcadas con FITC fueron preparadas por incubación con 0,5 mg/ml de FITC (Sigma, Poole, UK) durante 20 min a 37°C seguido de lavado extensivo.

1.2 Células

DC's fueron generadas de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (PBMC) como se ha descrito previamente (F. Sallusto y A. Lanzavecchia, 1994, J. Exp. Med. 179: 1109-1118; H. Uronen-Hansson *et al.*, 2004, Immunology 111: 173-178). En resumen, monocitos fueron preparados a partir de PBMC por centrifugado sobre gradientes de Percoll multifase. La fracción del monocito fue >95% CD14⁺/CD3⁻/CD19⁻. Para generar DC's, se incubaron los monocitos durante 7 días en RPMI suplementado con 10% FCS inactivado por calor, 2.4 mM de L-glutamina, 100 U/ml de Penicilina-Estreptomicina (todos de Gibco, Paisley, Reino Unido), 100 ng/ml de GM-CSF recombinante humano y 50 ng/ml de IL-4 recombinante humano (Schering-Plough, Welwyn Garden City, Herts, Reino Unido). DC's Inmaduras preparadas de esta manera fueron CD14^{low}, CD83^{-ve}, CD86^{low}, CD25^{-ve}. También expresaron HLA DR, HLA DQ, HLA Clase I, CD40 y CD1a, y fueron negativos para ambos CD 19 y CD3.

DC's a una concentración de 5x10⁵/ml fueron cultivadas con bacterias H44/76 de *N. meningitidis* a una proporción de DC/bacterias de 1:50 y 1:200 (como se indica en la leyenda de la figura) en RPMI 1640 suplementada con 10% de

FCS. Citoquinas intracelulares debían ser medidas, el inhibidor Brefeldina A (Sigma, Poole, UK) de transporte de la proteína fue añadido a 10 µg/mL.

La especificidad de unión del mutante de *IgtB* para DCs fue determinada incubando DC's inmaduras con 20 µg/ml anti-DC-SIGN mAb AZN-D1 durante 30 min a 37°C, y posteriormente con bacterias tipo salvaje y mutantes durante 45 min a 37°C.

1.3 Unión de DC e internalización

La unión de DC e internalización de bacterias fueron determinadas por una combinación de citometría de flujo y microscopia confocal. Para detección por citometría de flujo, DC'S fueron incubadas con bacterias marcadas con FITC durante períodos de tiempo entre 30 minutos y 24 horas, fijadas en FACSFix (BD), lavadas y analizadas en un FACSCalibur. DC's asociadas a bacterias fueron fácilmente identificadas por fluorescencia dentro de la población controlada por DC. Para microscopía confocal, DC's estimuladas con *N. meningitidis* marcada con FITC permitió la adhesión durante 10 min para una diapositiva de la adhesión (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, UK). Para detener la internalización, DC's fueron fijadas con 4% de PFA durante 10 min. DC's fueron visualizadas por coloración con 5 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti MHC Clase II (Dako, Glostrup, Dinamarca). Después del lavado, el anticuerpo unido fue detectado con 5 µg/ml de anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado de rojo Texas (sondas moleculares) durante 1 h. Los portaobjetos fueron lavados y montados en Citifluor (Citifluor Ltd, UK). Imágenes confocales fueron obtenidas usando un sistema de microscopio de escaneado por láser Leica SP2 confocal (Leica, Milton Keynes, UK) ajustado con conjuntos de filtro apropiados. Para identificar bacterias intracelulares, 15-20 secciones ópticas (0.2-0.5 µm) escaneando las DC's enteras fueron proyectadas y superpuestas con software de formación de imágenes Leica confocal.

1.4 Mediciones de citoquina

Para medir la producción de citoquina intracelular, DC's fueron fijadas con 4% de PFA en PBS durante 15 minutos, lavadas en PBS conteniendo 0,1% de azida sódica y 0,5% de BSA (todos de Sigma) y permeabilizadas en 25 µl de solución de permeabilización (Caltag). Las células fueron luego incubadas con anticuerpos monoclonales para TNF-α (Becton Dickinson BD, Oxford Reino Unido) y IL-12 p40/70 (Pharmingen) o controles coincidentes con isotipos durante 30 minutos a temperatura ambiente a oscuras. Las células fueron luego lavadas dos veces en PBS, fijadas en CellFix (Becton Dickinson) y analizadas por citometría de flujo en un FACSCalibur usando el software Cell Quest (Becton Dickinson). DC's compusieron una población diferente identificada por dispersión hacia adelante y en ángulo recto. Al menos el 95% de células en esta población fueron DC's como se define por su expresión de MHC II, CD1a, CD25; CD80; CD83 y CD86. Un mínimo de 3000 eventos dentro de las barreras correspondientes a DC fueron recogidos para análisis. Para ensayos de ELISA de citoquinas solubles, equipos CytoSets™ ELISA (Biosource Europe S.A, Nivelles Bélgica) para IL-12, TNF-α y IL-10, IL6 y IL1β humanos fueron usados según las instrucciones del fabricante.

1.5 Ensayo de adhesión a Fc-lectina tipo C soluble

Moléculas de Fc-lectina tipo C consisten en la parte extracelular del receptor de la lectina tipo C (DC-SIGN, MGL y Dectina-1B) fusionadas en el término COOH a un fragmento de IgG1-Fc humano (T. Geijtenbeek *et al.*, 2003, J. Exp. Med. 197: 7-17). El ensayo de adhesión de lectina-Fc soluble tipo C fue realizado de la siguiente manera. Células enteras (OD540=0.1) fueron revestidas sobre placas de ELISA (100 µl/pocillo) durante 18 horas a temperatura ambiente (RT), seguido de bloqueo con 1% de BSA durante 30 min a 37°C. Sobrenadante soluble de lectina-Fc tipo C fue añadido durante 2 h a RT. Fc-lectina tipo C no unida fue lavada y la unión fue determinada por anti-IgG1 ELISA.

1.6 Diferenciación de Th1/Th2 conducida por DC

DC fueron cultivadas de monocitos de donantes saludables en Medio de Dulbecco modificado de Iscove (Gibco), suplementado con 10% de FCS (BioWithaker, Verviers, Bélgica), 500 U/ml de IL-4 y 800 U/ml de GM-CSF (ambos de Schering-Plough). En el día 6 la maduración de DC fue inducida con tipo salvaje de *N. meningitidis* y mutante de *IgtB* a una multiplicidad de infección de 10. Los siguientes controles positivos fueron incluidos en el ensayo (i) respuesta de Th1/Th2 mezclada, 10 ng/ml de LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (ii) diferenciación de Th1, 20 µg/ml de poli I:C (Sigma-Aldrich) y (iii) diferenciación de Th2, 10 µg/ml de PGE2 10 ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich). En el día 2, DC fueron analizadas para marcadores de maduración (CD80; CD83; CD86 y HLA-DR) por citometría de flujo. Para evaluar la diferenciación de células T, DC maduras fueron incubadas con células T CD45RA⁺/CD4⁺ (5.10³ células T/ 20.10³ DC). En el día 12-15, células T inertes fueron reestimuladas con 10 ng/ml de PMA (Sigma-Aldrich) y 1 µg/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich) durante 6 horas. Después de 1 hora 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich) fue añadida a las células T. Producción de células individuales de IL-4 y IFN-γ fue determinado por análisis intracelular flujocitométrico. Las células fueron fijadas en el 2% de PFA, permeabilizadas con el 0,5% de saponina (Sigma-Aldrich) y teñidas con anti-IFN-γ humano-FITC y anti-IL-4 humano -PE (BD Pharmingen, San Diego, CA).

2. Ejemplo

Unión, e internalización de cepas mutantes de núcleo de oligosacárido de Neisseria meningitidis por DC's

Una técnica de citometría de flujo fue usada para investigar la unión e internalización del tipo salvaje de *N. meningitidis*, los mutantes del oligosacárido y el mutante deficitario de LPS por DC's humanas. DC's inmaduras fueron cocultivadas con cepas mutantes marcadas con FITC derivadas del tipo salvaje de *N. meningitidis* H44/76 a una proporción de DC/bacterias de 1:50 (Figura 2) y 1:200 (datos no mostrados) y analizadas por FACS para la presencia de bacterias marcadas con FITC asociadas a DC. El aumento dependiente del tiempo y de la dosis en asociación con DC fue observado tanto para el tipo salvaje como para los mutantes del oligosacárido. Difícilmente cualquier asociación de DC fue encontrada para el mutante deficitario de LPS en las primeras seis horas del curso del tiempo. El mutante de *lgtB* mostró una asociación de DC consistentemente más alta que los tipos salvajes o mutantes de *galE* a ambas concentraciones.

Para discernir entre unión bacteriana e internalización, usamos a continuación microscopía confocal para estudiar la internalización de DC del tipo salvaje de *N. meningitidis* y mutantes (no mostrado). Bacterias FITC fueron fácilmente detectadas como pequeñas partículas verdes en los portaobjetos. Colorante MHC Clase II fue usado para visualizar las DC's. La mayoría de las DC's había internalizado más *lgtB* ya después de 1 h de incubación en comparación con las bacterias tipo salvaje o el mutante de *galE*. Difícilmente cualquier internalización fue vista para el mutante deficitario de LPS. Además del nivel alto de internalización, la adherencia de superficie se mantuvo típicamente alto para las bacterias mutantes de *lgtB* en todo el curso del tiempo. Estos resultados confirman los resultados por FACS; asociación aumentada de bacterias con resultados de DC's en internalización aumentada de bacterias.

3. Ejemplo

Activación y maduración de DC's en respuesta a cepas mutantes de Neisseria meningitidis

Para estudiar la relación entre internalización de las bacterias y producción de citoquina, IL12 y TNF- α producidos por DC's en respuesta al tipo salvaje y los mutantes fueron medidos intracelularmente y se realizó el análisis simultáneo para internalización (Figura 3). DC's fueron cocultivadas con bacterias marcadas con FITC a una proporción de 1:50 durante 18 horas y luego teñidas para producción intracelular de TNF- α e IL12. Los cuadrantes fueron colocados para separar las células que se habían asociado a bacterias FITC de células que no tenían bacterias FITC unidas. Los porcentajes dados son el porcentaje de citoquinas intracelulares productoras de DC's (cuadrante derecho superior) o no productoras de DC's (cuadrante derecho inferior) después de la internalización de bacterias. El tipo salvaje, mutante de *lgtB* y *galE* fueron todos inductores potentes de la producción de TNF- α y IL-12 por DC's mientras que el mutante deficitario de LPS no lo fue. Prácticamente todas las DC's que habían internalizado el tipo salvaje de *N. meningitidis*, el mutante de *lgtB* y *galE* fueron productores de niveles altos de TNF- α . En el caso de IL-12, la producción fue encontrada para aproximadamente el 50% de las DC's que habían internalizado las bacterias marcadas con FITC.

Además de las mediciones de la citoquina intracelular, también medimos los niveles de la citoquina segregada por DC's en respuesta a *N. meningitidis* (Figura 4). DC's fueron cocultivadas con el mutante y bacterias tipo salvaje a proporción 1:200 durante 18 h y los sobrenadantes fueron recogidos para análisis de IL12, IL10, TNF- α , IL6 y IL-1 β segregados. Los resultados están mostrados como el porcentaje de producción de citoquina en comparación con el tipo salvaje (WT=100%). Tanto mutante de *lgtB* como el mutante de *galE* indujo algo menos IL 12, TNF- α y IL-1 β en comparación con las bacterias tipo salvaje. La producción de IL-10 y IL-6 de tanto *lgtB* como *galE* resulta asemejarse a la cepa tipo salvaje. Se observó difícilmente alguna producción de citoquina para la cepa deficitaria de LPS.

Finalmente, la maduración de DC's estimuladas con bacterias tipo salvaje y mutantes fue estudiada midiendo la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86 (Figura 5). La expresión de CD40 y en particular CD86 fue más alta cuando DC's fueron estimuladas con el mutante de *lgtB* en comparación con DC's estimuladas con bacterias tipo salvaje o mutantes de *galE*. Difícilmente cualquier expresión de CD40 y CD86 fue encontrada cuando DCs fueron estimuladas con el mutante de *lpxA*.

En conclusión, estos datos demuestran que la unión e internalización del mutante de *lgtB* por DC's resulta en activación y maduración de DC's comparable al nivel de activación y maduración de DC inducida con bacterias tipo salvaje.

4. Ejemplo

Identificación del receptor mediador de la unión e internalización del mutante de lgtB

La unión mejorada y absorción por DC's del mutante de *lgtB* nos incitó a investigar si esta unión e internalización es mediada por medio de un receptor de DC específico. Por lo tanto analizamos la capacidad de los tipos salvajes y los mutantes para unir receptores de lectina tipo C que son capaces de reconocer oligosacáridos y son altamente expresados en DCs inmaduras. La unión de un panel de quimeras de Fc-lectina tipo C a células enteras del tipo salvaje y bacterias mutantes fue estudiada en un ensayo de adhesión soluble (Figura 6). Mientras que el tipo salvaje, el mutante de *galE* y el mutante deficitario de LPS no unió ninguna de las quimeras de Fc-lectina tipo C, se encontró una fuerte unión DC-SIGN-Fc para el mutante de *lgtB*. La unión del mutante de *lgtB* a DC-SIGN fue también encontrada en

células HEK293T transitoriamente transfectadas con DC-SIGN o células K562 que expresan de forma estable DC-SIGN (datos no mostrados). Por otra parte, la especificidad del LPS de *lgtB* para DC-SIGN fue demostrada estudiando la fagocitosis de DC del mutante de *lgtB* en presencia o ausencia del anticuerpo de bloqueo anti-DC-SIGN AZN-D1 (Figura 7). En presencia de AZN-D1, la fagocitosis de *lgtB* por DC's fue reducida al nivel de unión observado para el tipo salvaje demostrando claramente que DC-SIGN une e internaliza el mutante de *lgtB*.

5. Ejemplo

El enfoque del mutante de lgtB para DC-SIGN inicia una respuesta inmunitaria de T_H1

Para valorar la relevancia funcional, si la hubiera, de la interacción del LPS del mutante de *lgtB* con DC-SIGN, estudiamos las respuestas de células T conducidas por DC después de impulsar DC inmadura bien con bacterias tipo salvaje o mutantes de *lgtB* fijadas con PFA. Ninguna diferencia, fue encontrada en la maduración de DCs impulsadas con DCs con bacterias tipo salvaje o mutantes de *lgtB* según fue evaluado por expresión de moléculas coestimuladoras y marcadores de maduración (Fig. 8a). No obstante, diferencias marcadas fueron observadas en los perfiles de T_H1/T_H2 inducidas con estas cepas (Fig. 8b). DC impulsadas con *N. meningitidis* de tipo salvaje generaron predominantemente una respuesta inmunitaria de tipo T_H2 dado que la mayoría de células T fueron productoras de IL-4. DC impulsadas con el mutante de *lgtB* evocó de forma predominante células T productoras de IFN- γ , así desplazando el equilibrio de células T_H1-versus T_H2 hacia T_H1. Este desplazamiento en equilibrio de T_H1/T_H2 fue observado en 3 donantes independientes. Estos datos indican que el enfoque específico de LPS de *lgtB* hacia DC-SIGN genera señales de DC que conducen la respuesta inmunitaria en T_H1, que es un fenómeno altamente deseable para los adyuvantes. Véase también P. Moingeon *et al.* (2001) Vaccine 19:4363-4372.

6. Ejemplo

Unión e internalización de oligosacárido/lípido A duplica las cepas mutantes de Neisseria meningitidis por DC's

Una técnica de citometría de flujo fue usada para investigar la unión e internalización del tipo salvaje de *N. meningitidis*, mutantes oligosacáridos de *lgtA* y *lgtB* y sus mutantes dobles de *lpxL1*, y el mutante deficitario de LPS por DC's humanas. DC's inmaduras fueron cocultivadas con cepas mutantes marcadas con FITC derivadas del tipo salvaje de *N. meningitidis* H44/76 a una proporción de DC/bacterias de 1:100 y analizadas por FACS para la presencia de bacterias marcadas con FITC asociadas con DC (figura 9). El mutante individual de *lgtB* mostró consistentemente una asociación a DC más alta que el tipo salvaje o el mutante individual de *lgtA*. Además, también en el entorno del mutante de *lpxL1* la mutación de *lgtB* resultó en una asociación más alta que las estructuras del oligosacárido de tipo salvaje o *lgtA*, indicando que la unión aumentada mediada por *lgtB* para DC-SIGN es también posible con el lípido A de *lpxL1* penta-acilado conteniendo LPS.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 200414417 A [0005]
- NL 9101359 A [0005]
- WO 0026384 A [0005]
- WO 0209746 A [0014] [0022]
- EP 1127137 A [0014]
- US 5997881 A [0014]
- US 5103661 A [0014]
- US 6290952 B [0014]

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

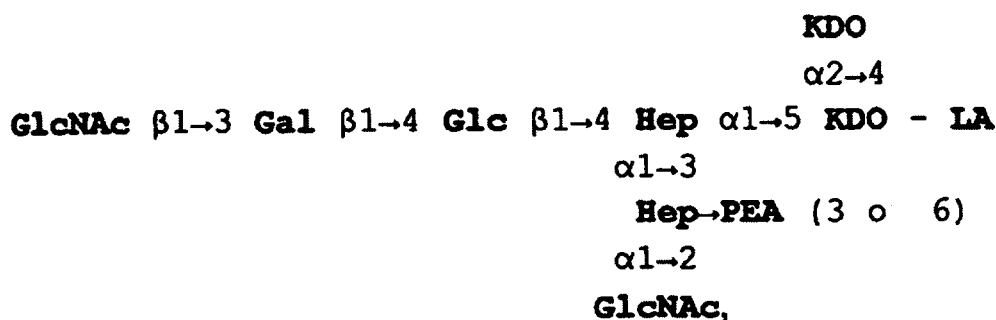
- Ley *et al.* Infect. Immun., 2001, vol. 69, 5981-5990 [0005]
- Steeghs *et al.* J. Endotoxin Res., 2004, vol. 10, 113-119 [0005]

ES 2 344 114 T3

- **Espevik; Niessen.** *J. Immunol. Methods*, 1986, vol. 95, 99-105 [0012]
- **Ziegler-Heitbrock et al.** *Int. J. Cancer*, 1988, vol. 41, 456-461 [0012]
- 5 • **Erwin et al.** *Infect. Immun.*, 1991, vol. 59, 1881-87 [0014]
- **Gu et al.** *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, 4047-53 [0014]
- **Polotsky et al.** *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, 210-14 [0014]
- 10 • **Gu et al.** *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, 1891-97 [0014]
- Remington's Pharmaceutical Science Mack Publishing 1980. [0017]
- 15 • **Holten.** *J. Clin. Microbiol.*, 1979, vol. 9, 186-188 [0024]
- **Jennings et al.** *Mol. Microbiol.*, 1993, vol. 10, 361-369 [0024]
- **Jennings et al.** *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 18, 729-740 [0024]
- 20 • **F. Sallusto; A. Lanzavecchia.** *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 179, 1109-1118 [0026]
- **H. Uronen-Hansson et al.** *Immunology*, 2004, vol. 111, 173-178 [0026]
- 25 • **T. Geijtenbeek et al.** *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 197, 7-17 [0031]
- **P. Moingeon et al.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 4363-4372 [0040]

REIVINDICACIONES

1. Uso de un LOS Neisserial en la producción de un medicamento para inmunización de un mamífero, donde el LOS Neisserial se representa por la fórmula (I):



donde LA es una fracción de lípido A tipo salvaje o una fracción de lípido A con toxicidad reducida y donde el LOS Neisserial se usa como un adyuvante.

2. Uso según la reivindicación 1, donde el LOS Neisserial se usa en combinación con un antígeno en la producción de un medicamento para aumentar una respuesta inmunitaria contra el antígeno en el mamífero.

3. Uso según la reivindicación 2, donde el antígeno proviene de o es producido por una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, una célula cancerosa o un alérgeno.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde LA es una fracción de lípido A cuya toxicidad es inferior al 80% de la toxicidad de una fracción de lípido A tipo salvaje, según es determinado en un ensayo WEHI.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la fracción de lípido A es seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una fracción de lípido A como es obtenible de una cepa de Neisseria con una mutación que reduce la actividad o inactiva el gen *alpxL1* o *lpxL2* o un homólogo de los mismos;

(b) una fracción de lípido A como es obtenible por eliminación de uno o más ácidos grasos secundarios O-enlazados esterificados de una fracción de lípido A tipo salvaje por tratamiento con una aciloxihidrolasa;

(c) una fracción de lípido A como es obtenible por tratamiento de hidracina de una fracción de lípido A tipo salvaje;

(d) una fracción de lípido A como es obtenible por desfosforilación con una fosfatasa alcalina.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la fracción de lípido A es seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una fracción de lípido A con un C₁₂-acilo secundario sólo en la glucosamina reductora;

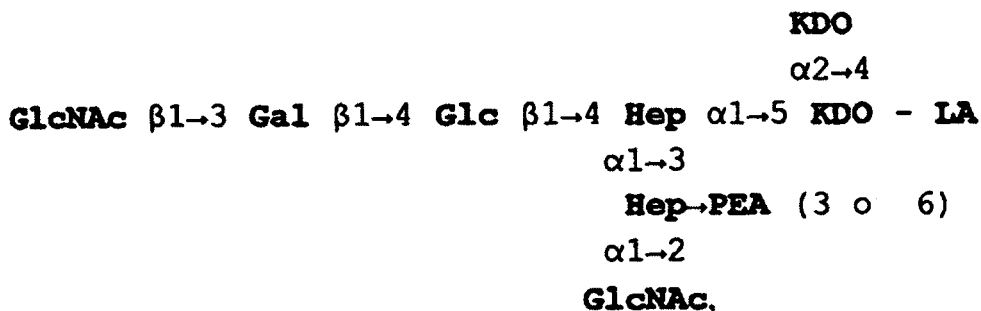
(b) una fracción de lípido A con un C₁₂-acilo secundario sólo en la glucosamina no reductora;

(c) una fracción de lípido A carente de ambos grupos C₁₂-acilo secundarios;

(d) una fracción de lípido A carente de uno o más grupos fosfato de bien la posición 1 o 4'; y,

(e) una fracción de lípido A con una combinación de las desacilaciones en (a); (b) o (c) y las desfosforilaciones en (d).

7. LOS Neisserial representado por la fórmula (I):



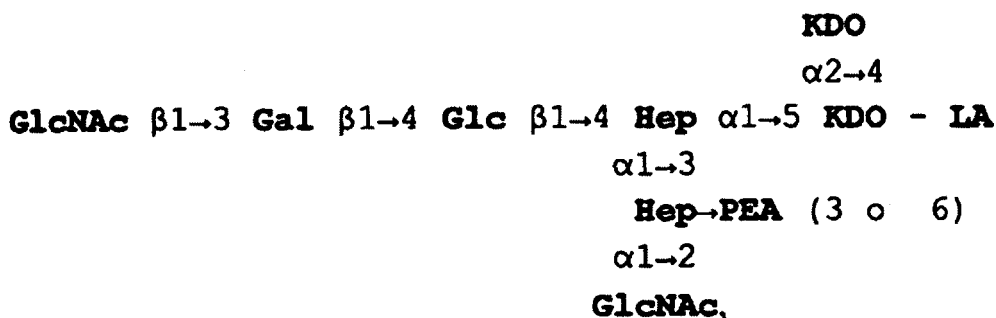
donde LA es una fracción de lípido A tipo salvaje o una fracción de lípido A con toxicidad reducida, para el uso como adyuvante en un tratamiento para inmunización de un mamífero.

8. LOS Neisserial según la reivindicación 7, donde el LOS Neisserial se usa en el tratamiento en combinación con un antígeno para aumentar una respuesta inmunitaria contra el antígeno en el mamífero.

9. LOS Neisserial según la reivindicación 8, donde el antígeno proviene de o es producido por una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, una célula cancerosa o un alérgeno.

10. LOS Neisserial según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde LA es una fracción de lípido A tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4-6.

11. Composición que comprende un LOS Neisserial representado por la fórmula (I):



donde LA es una fracción de lípido A tipo salvaje o una fracción de lípido A con toxicidad reducida, donde la composición además comprende un antígeno de o producido por un virus, un hongo, un parásito, una célula cancerosa, un alérgeno o una bacteria, donde la bacteria es seleccionada del grupo que consiste en *Helicobacter*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Chlamydia*, *Streptococcus*, *Vibrio*, un patógeno entérico Gram-negativo, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia*, y bacterias causantes del ántrax, la lepra, la tuberculosis, la difteria, enfermedad de Lyme, sífilis, o fiebre tifoidea, y donde la composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

12. Composición según la reivindicación 11, donde la toxicidad de la fracción de lípido A es inferior al 80% de la toxicidad de una fracción de lípido A de tipo salvaje, como es determinado en un ensayo WEHI.

13. Composición según la reivindicación 11 o 12, donde la fracción de lípido A es seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una fracción de lípido A según es obtenible de una cepa de *Neisseria* con una mutación que reduce la actividad o inactiva el gen *alpxL1* o *lpxL2* o un homólogo del mismo;

(b) una fracción de lípido A según es obtenible por eliminación de uno o más ácidos grasos secundarios O-enlazados esterificados de una fracción de lípido A tipo salvaje por tratamiento con una aciloxihidrolasa;

(c) una fracción de lípido A como es obtenible por tratamiento de hidracina de una fracción de lípido A de tipo salvaje;

(d) una fracción de lípido A como es obtenible por desfosforilación con una fosfatasa alcalina.

ES 2 344 114 T3

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde la fracción de lípido A es:

(a) una fracción de lípido A con un C₁₂-acilo secundario sólo en la glucosamina reductora;

5 (b) una fracción de lípido A con un C₁₂-acilo secundario sólo en la glucosamina no reductora;

(c) una fracción de lípido A carente de ambos grupos secundarios C₁₂-acilo;

10 (d) una fracción de lípido A carente de uno o más grupos fosfato sea de la posición 1 o 4'; y,

(e) una fracción de lípido A con una combinación de las desacilaciones en (a); (b) o (c) y las desfosforilaciones en (d).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

inmunotipo L3 de LPS H44/76 de *Neisseria meningitidis*

mutante de núcleo del oligosacárido

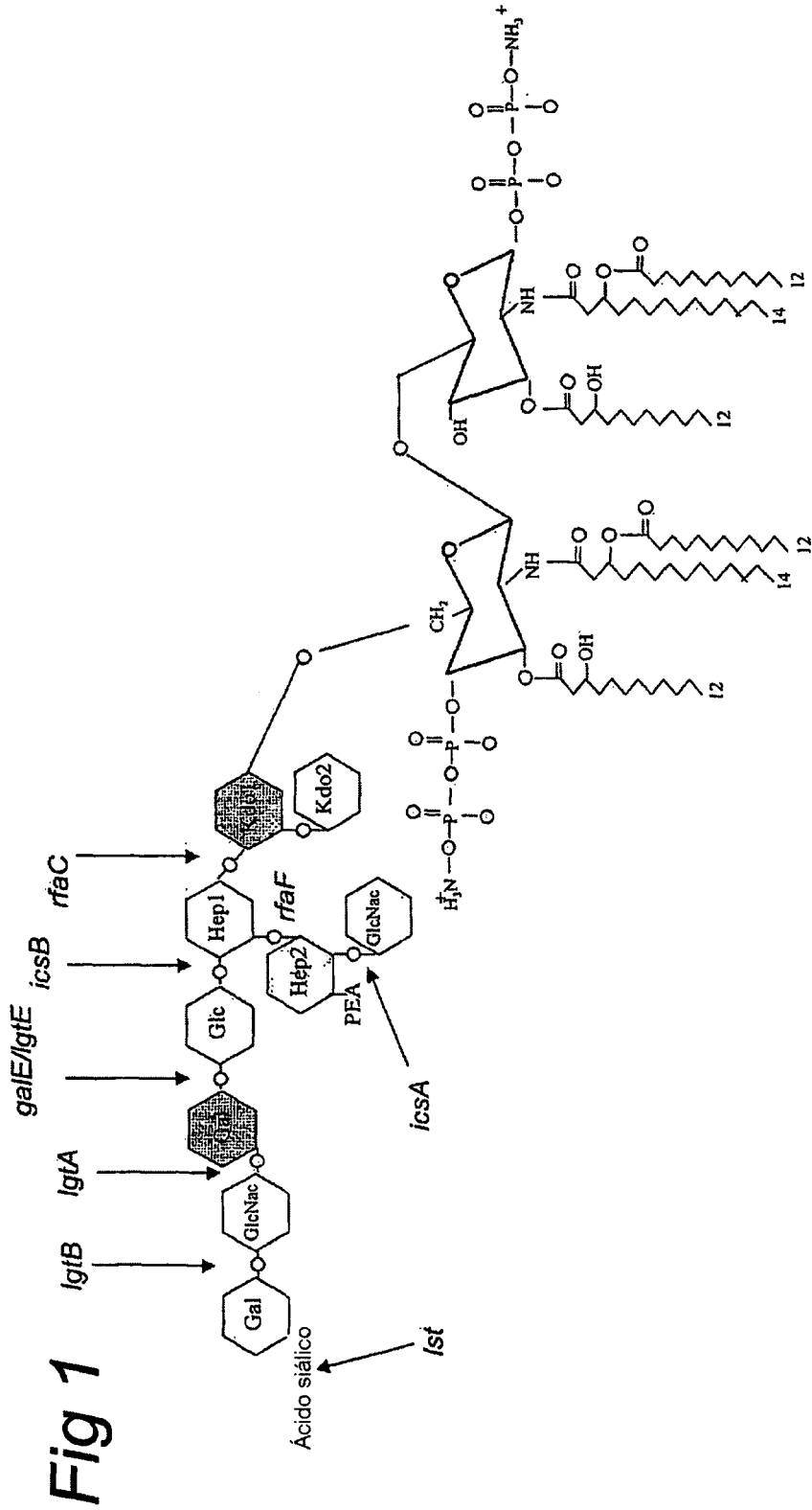


Fig 2

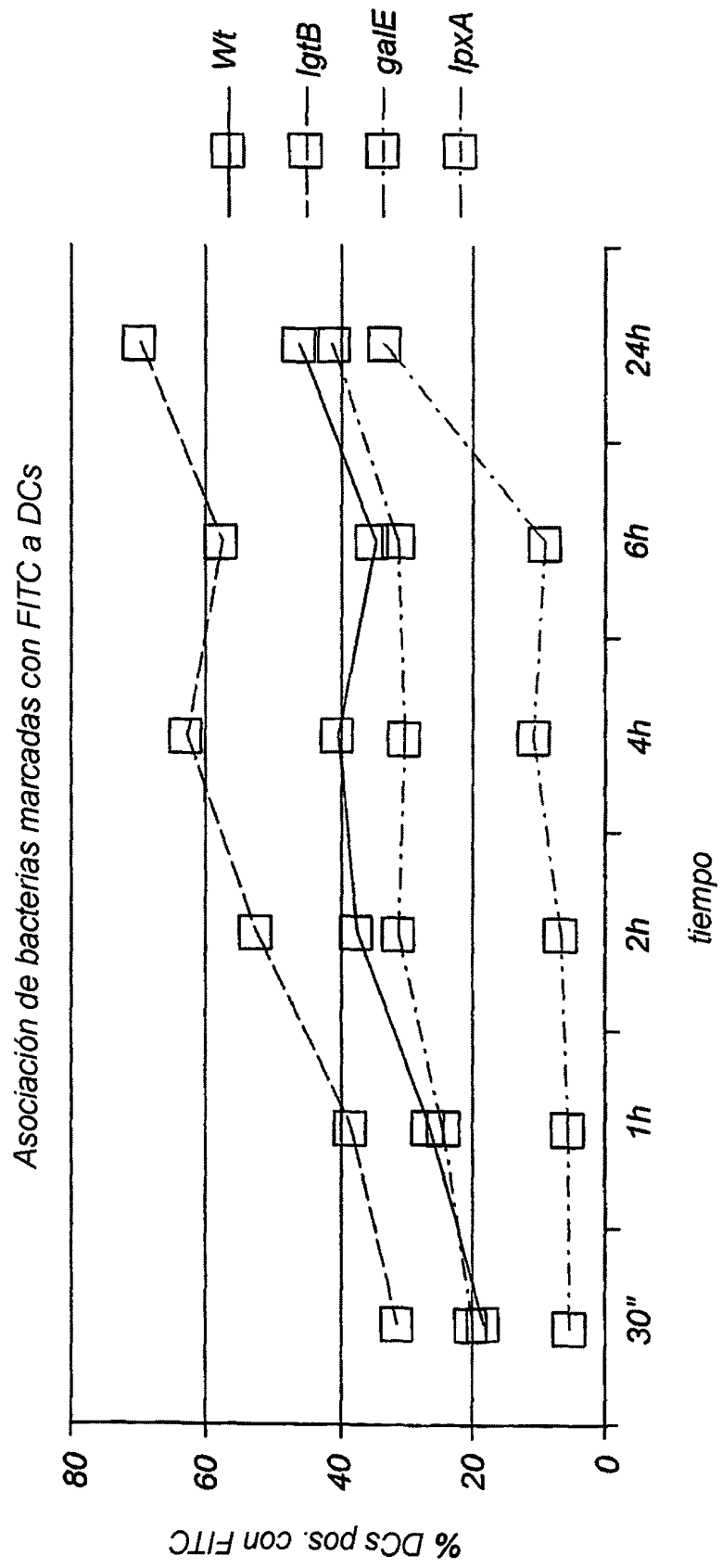


Fig 3a

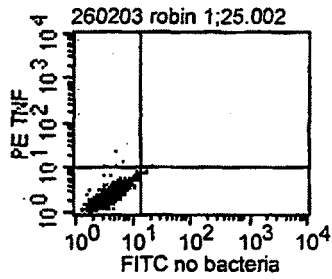


Fig 3b

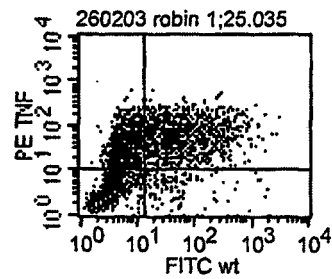


Fig 3c

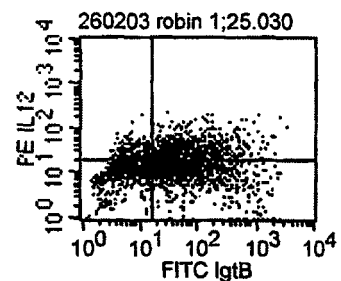
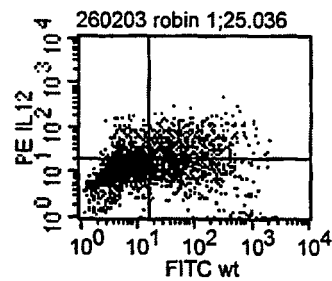
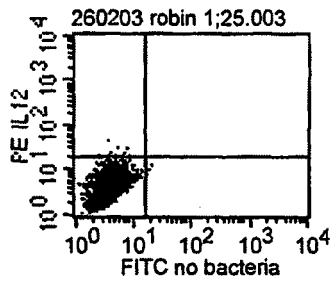
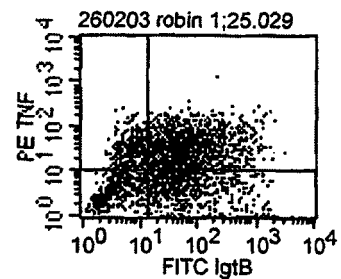


Fig 3d

Fig 3e

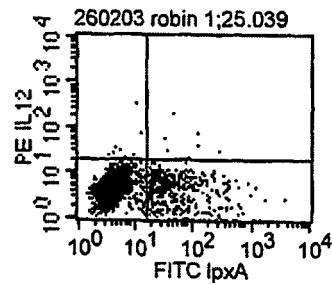
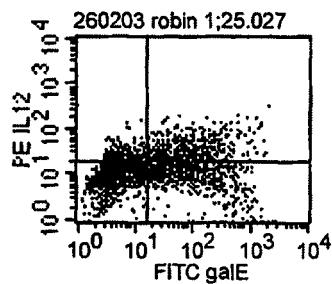
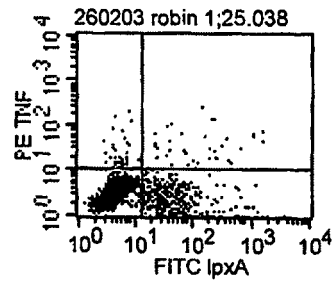
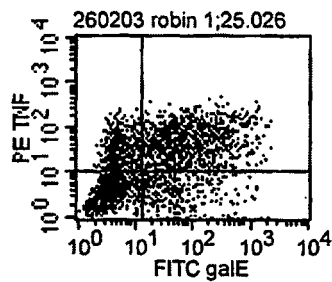


Fig 4a

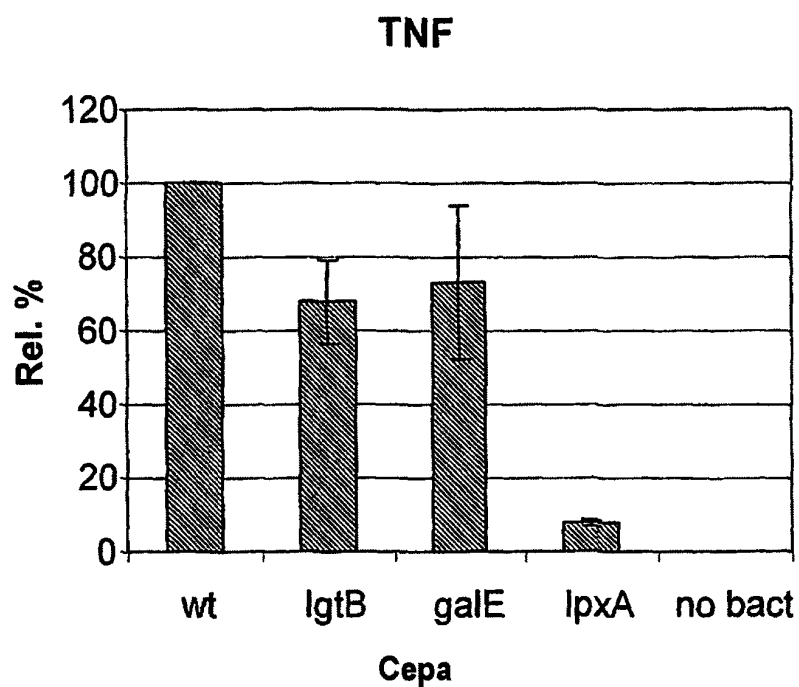


Fig 4b

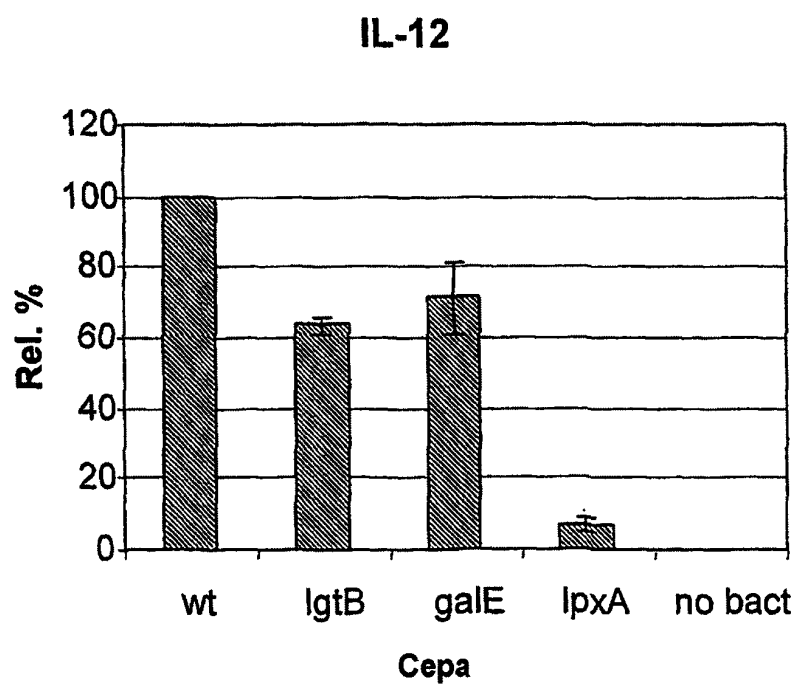


Fig 4c

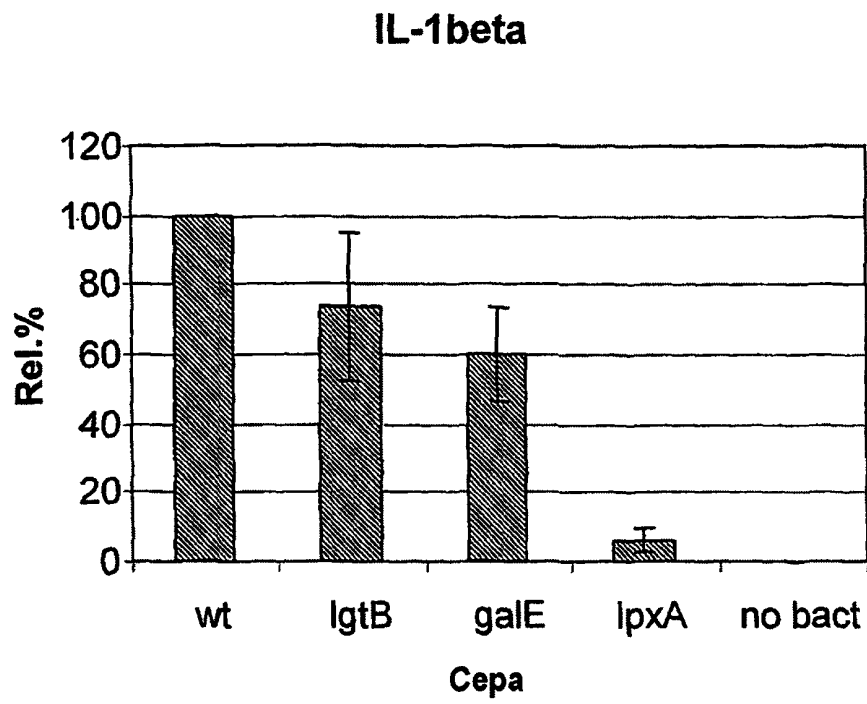


Fig 4d

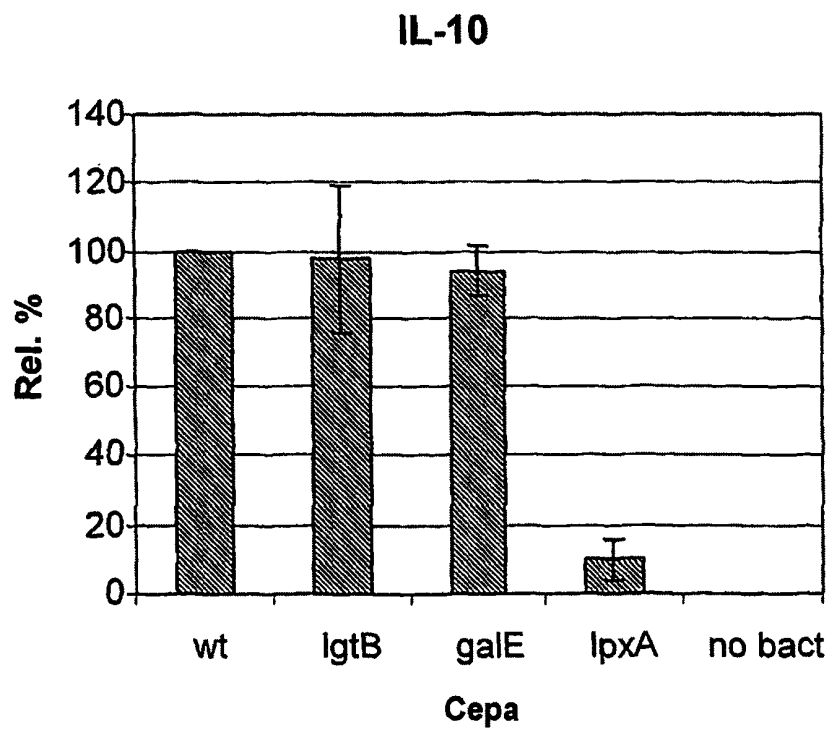


Fig 4e

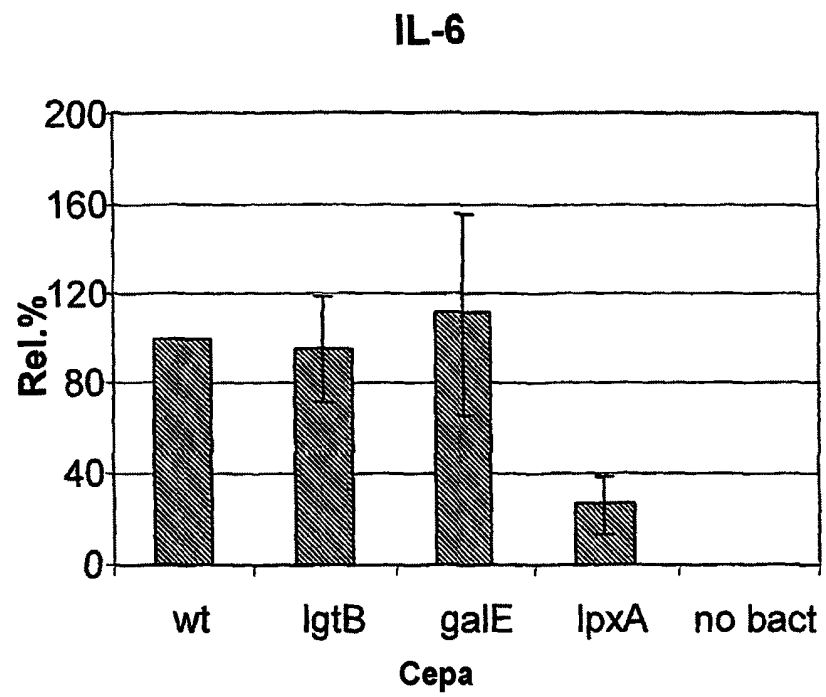


Fig 5

Expresión de la molécula coestimuladora por DCs

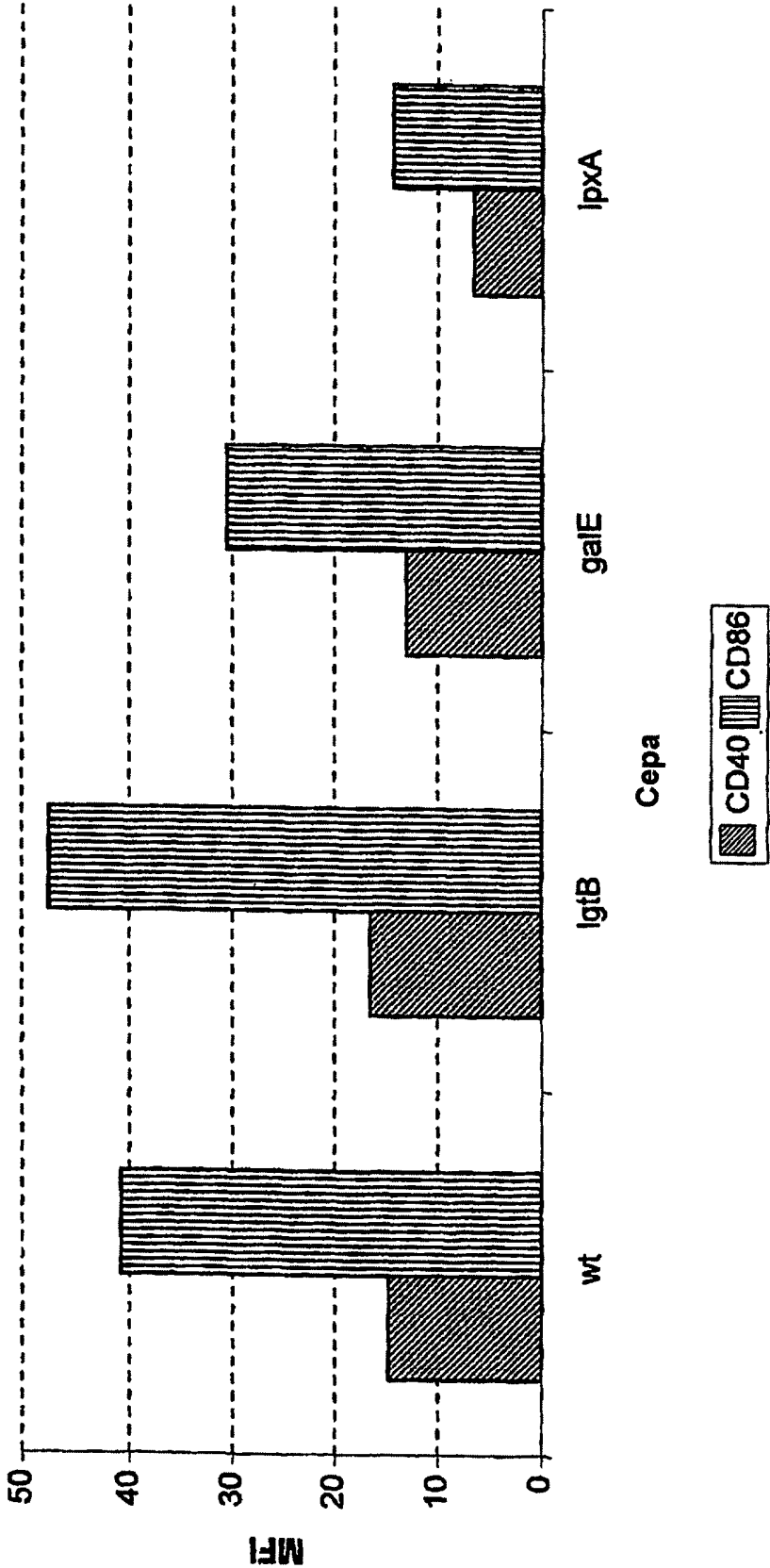


Fig 6

Unión de Fc-lectina tipo C a células enteras de *Neisseria meningitidis*

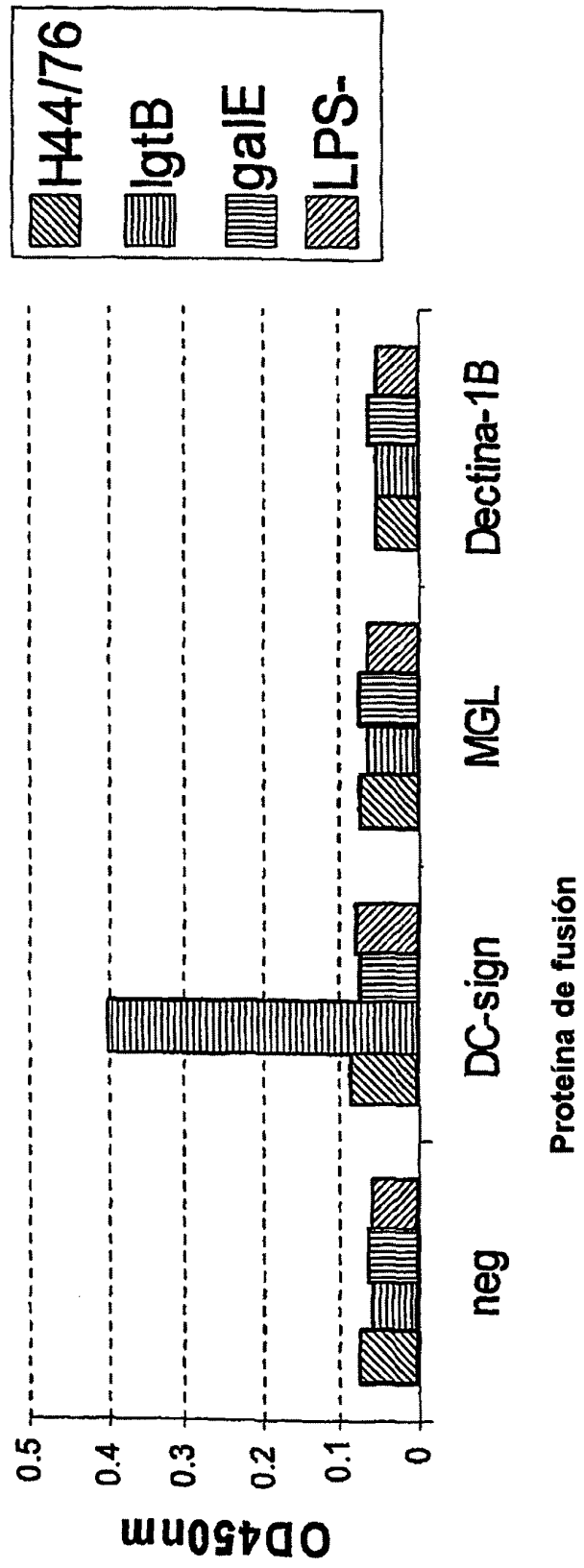


Fig 7

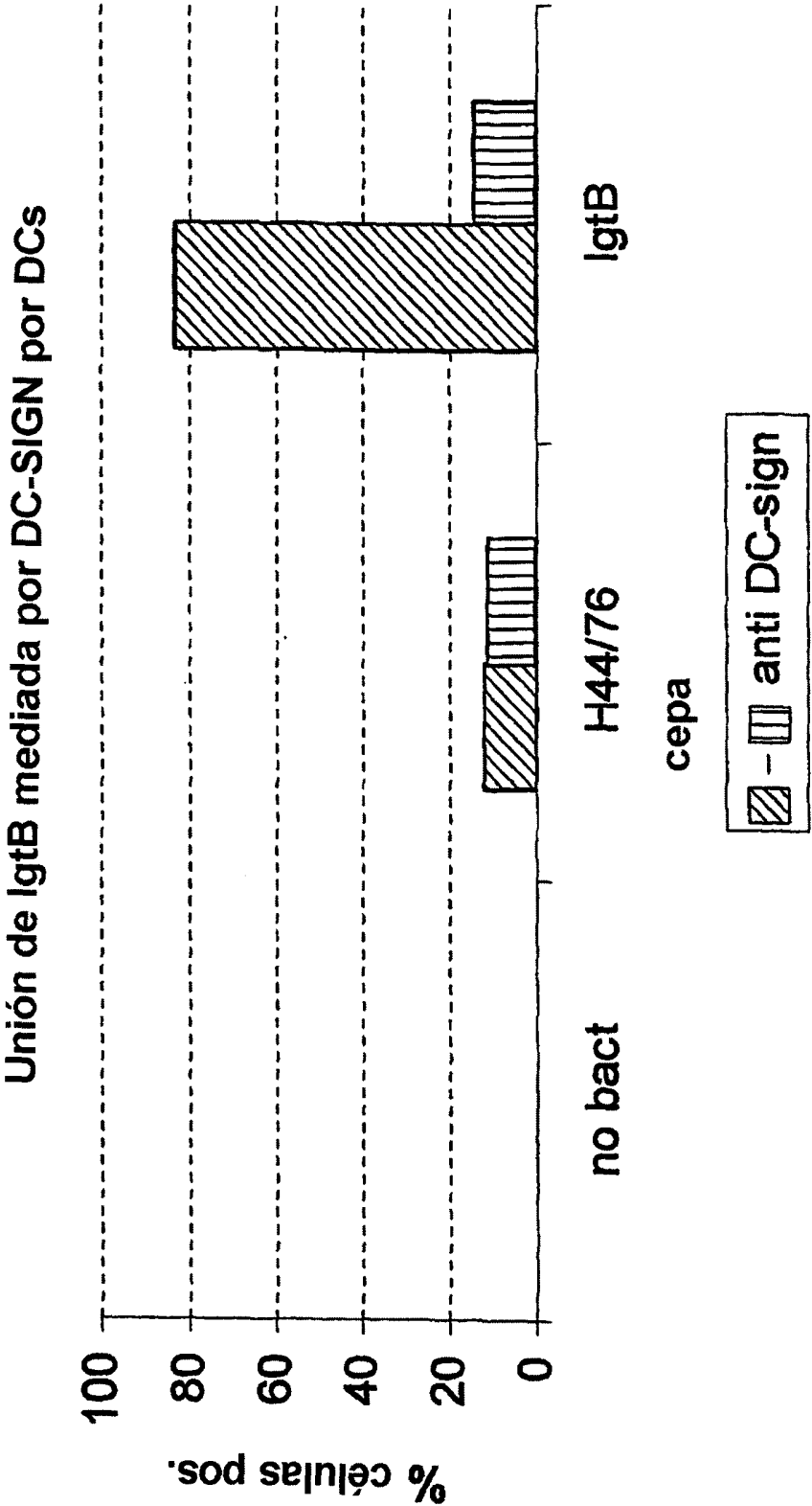


Fig 8a

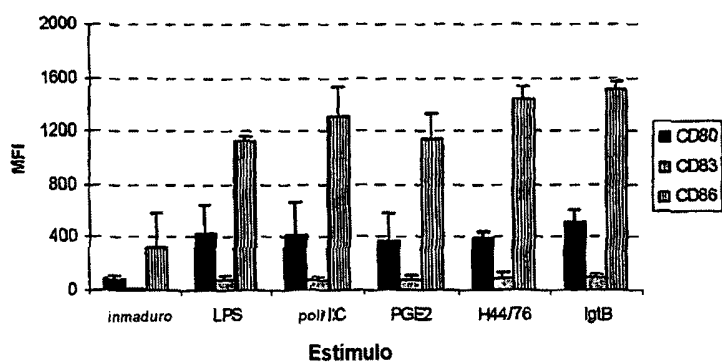


Fig 8b

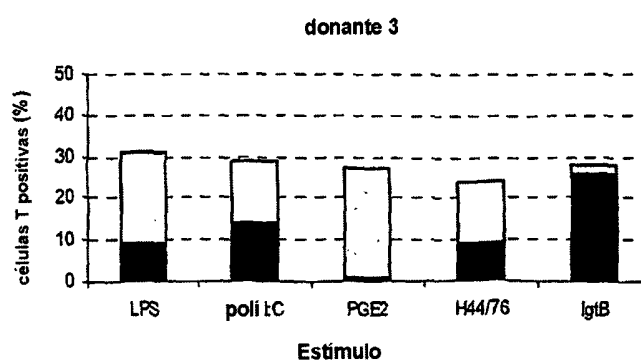
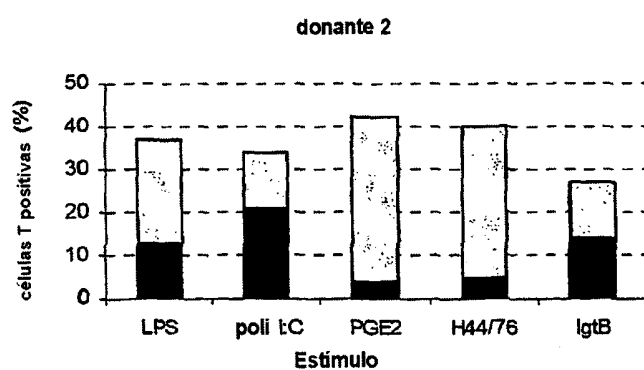
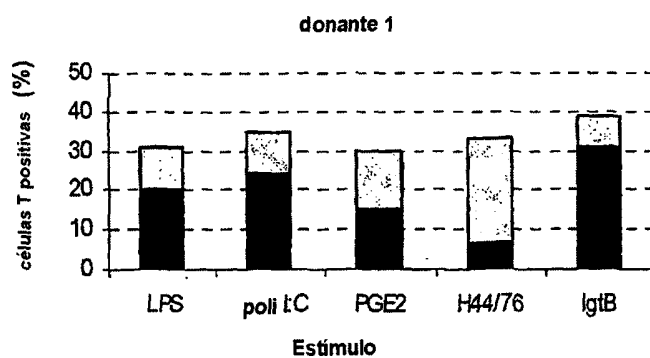


Fig 9a

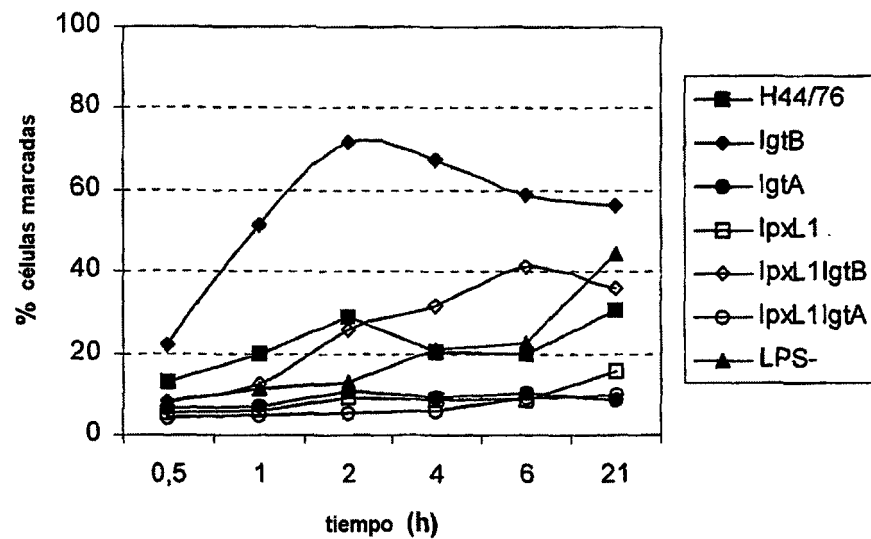


Fig 9b

