



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 753**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04768807 .2**
96 Fecha de presentación : **08.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1687011**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **Célula entera modificada, extracto de célula y vacunas basadas en OMV.**

30 Prioridad: **09.10.2003 GB 0323709**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

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

72 Inventor/es: **Gorringe, Andrew R.;
Reddin, Karen M.;
Gray-Owen, Scott D. y
Boulton, Ian C.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 310 753 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

Célula entera modificada, extracto de célula y vacunas basadas en OMV.

5 La invención se refiere a células enteras modificadas, extractos de células y composiciones basadas en OMV y sus componentes para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por bacterias Gram negativo, en particular enfermedades causadas por *Neisseria*.

10 Un número significativo de patógenos de humanos y animales pertenece a la clasificación de bacterias Gram negativo, incluyendo a los miembros de los géneros *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Escherichia*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Yersinia*. La *Neisseria meningitidis* (el meningococo) es el organismo que causa la meningitis meningocócica y que tiene una importancia particular como un problema de salud mundial. En muchos países la incidencia de esta enfermedad está aumentando. La *N. meningitidis* es también responsable de la septicemia meningocócica, que está asociada al rápido inicio de síntomas y a la alta mortalidad, siendo alrededor del 22% de los casos mortales. Otras bacterias Gram negativo causan un rango de infecciones humanas incluyendo la meningitis (*H. influenzae*), peste (*Y. pestis*), gastroenteritis (*E. coli*), enfermedades venéreas (*N. gonorrhoeae*) e infección nosocomial (*P. aeruginosa*).

20 Es deseable proporcionar vacunas de amplio espectro que proporcionen inmunidad protectora en animales, particularmente seres humanos, contra la infección bacteriana de Gram negativo.

25 Las vesículas de la membrana externa (OMV, según sus siglas en inglés: "Outer Membrane Vesicles") derivadas del patógeno humano *Neisseria meningitidis* son actualmente utilizadas como una fuente de antígenos para conseguir una vacuna meningocócica protectora.

30 Para tratar las dificultades asociadas con el logro de un amplio espectro de protección, los investigadores han intentado "enriquecer" las OMV con antígenos particulares que podrían realzar el potencial inmunogénico de las OMV. En el documento WO-A-00/25811 se combinan OMV aisladas de *N. meningitidis* con antígenos heterólogos, por ejemplo, la proteína de unión de transferrina (Thp), o una *N. meningitidis* genéticamente modificada expresa tales antígenos recombinantemente y las OMV enriquecidas con antígenos son derivadas a partir de ésta. Un enfoque similar fue adoptado en el documento WO-A-01/09350 que describe composiciones de vacuna que comprenden las OMV de *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* y *H. influenzae*. En ciertas realizaciones estos organismos han sido modificados genéticamente para sobreexpresar restos inmunogénicos particulares.

35 Una dificultad con tales vacunas basadas en OMV es que, para alcanzar la protección adecuada, las vacunas tienen que ser administradas en intervalos frecuentes, o tienen que darse refuerzos de la vacuna para mantener una respuesta inmune protectora.

40 A pesar de la disponibilidad de las eficaces terapias con antibióticos para combatir la infección, *Neisseria gonorrhoeae* causa aproximadamente 78 millones de infecciones a escala mundial por año. La gonorrea se caracteriza por una intensa respuesta inflamatoria que conduce a la liberación de grandes cantidades de pus uretral o cervical, que consiste principalmente en neutrófilos con *N. gonorrhoeae* asociado extracelular e intracelular. Hasta el 15% de los hombres infectados y el 80% de las mujeres infectadas quedan asintomáticos. En tales situaciones, la infección tiende a ser prolongada y es consecuentemente transmisible, tanto verticalmente (a los recién nacidos de madres infectadas) como horizontalmente (a compañeros sexuales). De no ser detectadas, tales infecciones son una fuente de morbilidad significativa, incluyendo conjuntivitis severa en recién nacidos, infección gonocócica diseminada, enfermedad pélvica inflamatoria y esterilidad por cicatrización en las trompas de Falopio.

50 La persistencia de *N. gonorrhoeae* dentro de la población se basa en el hecho de que la gonorrea puede ser contraída repetidamente, y hay pocas pruebas de que la exposición o la colonización por este organismo reduce la predisposición de un individuo a una infección subsecuente. Esto es al menos parcialmente atribuible a la variación antigénica de epítomos de superficie gonocócicos, sin embargo, los individuos pueden ser infectados de nuevo por el mismo serotipo de *N. gonorrhoeae* indicando que la evasión inmune no es la única estrategia de supervivencia usada por este patógeno.

55 Consecuentemente, se desea proporcionar una mejor vacunación contra la infección gonocócica inicial o repetitiva.

60 Las proteínas asociadas a la opacidad de la colonia (Opa) expresadas por la especie *Neisseria* son un importante determinante de la virulencia. Boulton *et al.*: *Nat Immunol.*, marzo de 2002; **3** (3):229-36 describen cómo, *in vitro*, las proteínas Opa suprimieron la activación y proliferación de linfocitos T. Las proteínas Opa son descritas a través de la literatura como ideales objetivos de vacuna. Wiertz *et al.* (*Infect Immun.*, enero de 1996; **64** (1):298-304.) y De Jonge *et al.* (*Infect Immun.*, mayo de 2003; **71** (5):2331-40.) identificaron a los anticuerpos de Opa como importantes en la protección contra la infección gonocócica. De Jonge *et al.* señalaron cómo los anticuerpos de Opa reducían la adherencia de *Neisseria* y así propusieron incluir Opa en la vacunación. Schneider *et al.*, *J Infect Dis.*, julio de 1995; **172** (1):180-5.) propusieron el uso de una vacuna basada en Opa contra la gonorrea. Plummer *et al.*, (*J. Clin. Invest.* 1994; **93**: 1748-1755) correlacionaron anticuerpos con Opa con un menos riesgo de salpingitis gonocócica y propusieron vacunas basadas en Opa. Boulton *et al.*, *Nature Immunol*, 2002, vol **3**, pp. de 229 a 236 y Normark Staffan *et al.*, *Nature Immunol*, 2002, vol **3** N°. **3** pp. de 210 a 211 estudian la interacción de Opa y CEACAM1 en *Neisseria gonorrhoeae*.

Un objeto de la presente invención es proporcionar microorganismos, composiciones y vacunas, incluyendo vacunas basadas en OMV para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades ocasionadas por bacterias Gram negativo. Un objeto de los objetos específicos de la invención es proporcionar tal vacuna que solucione, o al menos mejore, los problemas asociados con la vacunación actual contra enfermedades meningocócicas y gonorrea.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición que comprende vesículas de la membrana externa de *Neisseria* que contienen Opa que no se une a *CEACAM1* y que no tienen sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o la prevención de una enfermedad meningocócica, en la que las vesículas de la membrana externa son de *Neisseria* que han sido modificadas por mutación para expresar una Opa que no se une a *CEACAM1*.

En consecuencia, la invención se refiere a microorganismos, composiciones, vacunas, componentes de vacunas, métodos para obtener los anteriormente mencionados y genes que codifican los anteriormente mencionados, sustancialmente sin Opa que se una a *CEACAM1*. Estos son adecuados para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por bacterias Gram negativo. La invención también se refiere a microorganismos, composiciones, vacunas, componentes de vacunas, métodos para obtener los anteriormente mencionados y genes que codifican los anteriormente mencionados que son adecuados para el tratamiento o la prevención de enfermedades meningocócicas o enfermedades gonocócicas y que están sustancialmente sin proteínas que supriman la activación o la proliferación de células T CD4+.

Los microorganismos son típicamente bacterias Gram negativo, especialmente *Neisseria*, que se seleccionan por no tener sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1* o que se modifican para no tener sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1*. Se modifican por mutación para expresar una Opa que no se une a *CEACAM1*. Las composiciones de la invención contienen tales bacterias o sus extractos inmunogénicos, por ejemplo, sus preparaciones de proteínas. Las vacunas que comprenden los microorganismos o sus extractos pueden contener bacterias vivas, bacterias vivas atenuadas o bacterias muertas. Generalmente, en adelante en este documento, las referencias a las composiciones de la invención se pretende que se refieran a todos los microorganismos, composiciones, vacunas, y componentes de vacunas, a no ser que se indique de otra manera.

La invención también se refiere a un método para seleccionar un microorganismo, composición, vacuna o componente de vacuna, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad causada por bacterias Gram negativo, comprendiendo el método determinar si dicho microorganismo, dicha composición, vacuna o componente de vacuna no tienen sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1*.

Un método más relacionado con la invención es uno para seleccionar un microorganismo, composición, vacuna o componente de vacuna, para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades meningocócicas o enfermedades gonocócicas, que comprende determinar si dicho microorganismo, composición, vacuna o componente de vacuna no tiene sustancialmente la proteína que suprime la activación o la proliferación de una célula T CD4+.

Dicho microorganismo, composición, vacuna o componente de vacuna preferiblemente no tiene sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1* o está modificado de modo que no tenga sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1*. En un método preferido una *Neisseria* se selecciona para no tener sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1* o se modifica, tal como por mutación como se describe más detalladamente más abajo, de modo que no tenga sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1*.

Una población de bacterias Gram negativo descrita en este documento, que comporta 1.000 o más en cantidad, no tiene sustancialmente bacterias que expresen Opa que se una a *CEACAM1*. Las composiciones son obtenidas a partir de ésta de la misma manera que estén sustancialmente sin Opa que se una a *CEACAM1*.

En otra realización, la presente aplicación describe una composición, que comprende vesículas de la membrana externa de bacterias Gram negativo, preferiblemente vesículas de la membrana externa de *Neisseria*, en la que las vesículas no tienen sustancialmente Opa.

El contenido de Opa de las vesículas preferiblemente se reduce en al menos un factor de 10 comparado con el contenido de Opa de las OMV obtenido a partir de *Neisseria* normal, siendo la prueba patrón para la *Neisseria* normal el contenido de Opa de las OMV obtenido a partir de la cepa de *N. meningitidis* K454, y más especialmente la Opa representa el 0,5% en peso o menos del contenido de proteína total de las OMV.

Las composiciones de la invención comprenden vesículas de la membrana externa, en las que las vesículas comprenden una proteína Opa que no se une a *CEACAM1*. Estas vesículas además no tienen sustancialmente Opa que se una a *CEACAM1*.

También se describe en este documento una composición que comprende vesículas de la membrana externa, en la que las vesículas comprenden una proteína que es antigénica, genera la producción de anticuerpos que se unen a Opa, y no se unen a *CEACAM1*. La proteína puede ser un mutante o variante o fragmento o derivado o mímico de Opa.

Todavía una composición más descrita en este documento comprende vesículas de la membrana externa, en la que las vesículas comprenden un antagonista que inhibe la unión de Opa a *CEACAM1*.

El término “Opa” se refiere a una proteína asociada de opacidad de colonia Gram negativo, especialmente *Neisseria*, que puede modular o suprimir una respuesta inmune o inhibir el crecimiento de tumores. Preferiblemente, la proteína Opa puede unirse a *CEACAM1* y causar la unión de *CEACAM1* con la consiguiente supresión inmune o inhibición de una célula inmune.

Las proteínas Opa específicas incluyen Opa₅₂ y Opa₅₇. Ya que las proteínas Opa de *Neisseria* son altamente variables antigénicamente, la proteína Opa puede ser cualquiera de las proteínas Opa que pueden ser expresadas por varias especies de *Neisseria* y que también se unen al receptor de *CEACAM1* o a receptores homólogos no humanos. Las proteínas Opa incluyen las proteínas Opa codificadas por cualquier especie de *Neisseria*, incluyendo las patógenas *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* y especies comensales tales como *Neisseria lactamica* y *Neisseria subflava*, para las cuales se ha demostrado que sus proteínas Opa se unen a *CEACAM1*, y otras comensales que también expresan proteínas Opa.

La expresión “proteína Opa” también se refiere a proteínas análogas de otras especies bacterianas. Esto incluye, pero no se restringe a, las proteínas de unión de *CEACAM1* de *Haemophilus influenzae*. Como las proteínas Opa de *Neisseria*, las proteínas P5 de *H. influenzae* son proteínas de la membrana externa antigénicamente variables que se ha predicho que forman una estructura de barril beta con ocho regiones transmembrana y cuatro bucles extracelulares. Como con las proteínas Opa, las regiones transmembrana P5 y el 4º bucle expuesto a la superficie están bien conservados, mientras que la secuencia dentro de otros bucles expuestos a la superficie es variable. También como varias de las proteínas Opa de *Neisseria*, las proteínas P5 de *H. influenzae* funcionan en la unión a células huésped vía la unión a receptores de *CEACAM*, incluyendo *CEACAM1*.

En la presente invención, los inventores proporcionan composiciones que carecen a propósito o, al menos, tienen un menor contenido de Opa reactivo con *CEACAM1*. También los inventores proporcionan composiciones que contienen mutantes o variantes o fragmentos o derivados o mímicos de Opa, cuyos mutantes, variantes, fragmentos, mímicos y derivados no activan a *CEACAM1*. Estas composiciones ofrecen así la base de vacunas contra enfermedades, especialmente la enfermedad causada por *Neisseria*, más especialmente enfermedades meningocócicas y gonocócicas, con un mejor desarrollo de la respuesta inmune y la memoria inmune en pacientes. Los mutantes, variantes, fragmentos y derivados permiten que se generen *in vivo* anticuerpos anti-Opa y otras respuestas inmunes sin las desventajas de la activación de *CEACAM1*, por ejemplo sin la supresión inmune y/o la reducción de la memoria inmune.

Las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de pacientes, pacientes típicamente humanos, y la invención proporciona un método de tratamiento de un individuo que comprende administrar una composición de la invención.

La invención también prevé la fabricación de composiciones para la vacunación y para componentes de vacuna. Así, en un aspecto más, la presente invención proporciona un método para fabricar un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad meningocócica, comprendiendo el método:

- (a) obtener una *Neisseria*;
- (b) determinar si la *Neisseria* expresa una proteína Opa que se une a *CEACAM1*;
- (c) si la *Neisseria* expresa una proteína Opa que se une a *CEACAM1*, desechar la *Neisseria* y la etapas de repetición (a) a (c);
- (d) conservar la *Neisseria* si expresa a un mutante o variante o fragmento o derivado de Opa, en la que el mutante o la variante o fragmento o derivado no se une a *CEACAM1*;
- (e) generar un anticuerpo frente al mutante o fragmento o derivado;
- (f) determinar si el anticuerpo también se une a una proteína Opa que se une a *CEACAM1*; y
- (g) preparar una composición que comprenda la *Neisseria* conservada de la etapa (d).

También se describe en este documento un método para preparar una composición para su uso tal cual o en la fabricación de una vacuna, que comprende:

- (a) obtener una bacteria Gram negativo;
- (b) determinar si la bacteria expresa una proteína Opa que se une a *CEACAM1*;
- (c) si la bacteria expresa la proteína Opa, desechar la bacteria y las etapas de repetición (a) a (c);
- (d) conservar la bacteria si ésta no expresa la proteína Opa; y
- (e) preparar una composición que comprenda la bacteria conservada de la etapa (d).

ES 2 310 753 T3

En esta invención la bacteria es preferiblemente una *Neisseria*.

La bacteria puede ser una que no exprese Opa reactiva con *CEACAM1*, pero que sí produzca Opa no funcional. Los métodos de la invención incluyen una etapa más de conservar una bacteria que exprese a un mutante o variante o fragmento o derivado o mímico de Opa, en el que el mutante o la variante o el fragmento o el derivado o mímico no se une a *CEACAM1*.

Tales mutantes o variantes o fragmentos o derivados o mímicos de Opa pueden surgir naturalmente en la población bacteriana. Un método preferido de la invención, sin embargo, es uno que induce la producción de tales proteínas, y que comprende:

- (a) obtener una *Neisseria*;
- (b) llevar a cabo la mutagénesis sobre la *Neisseria*;
- (c) determinar si la *Neisseria* expresa a un mutante o fragmento o variante o derivado o mímico de una proteína Opa que no se une a *CEACAM1*;
- (d) aislar al mutante o la variante o fragmento o derivado o mímico; en el que el mutante o variante o fragmento o derivado no se une a *CEACAM1*.

Las especies de *Neisseria* son naturalmente competentes y susceptibles de sufrir mutagénesis vía la recombinación entre secuencias de ADN homólogas y, además, la disponibilidad de las secuencias del genoma entero meningocócico y gonocócico permite la determinación exacta de los sitios adecuados donde realizar la mutagénesis.

Un método para crear u obtener una bacteria de la invención es clonar un gen de Opa, insertar el gen clonado en un vector de expresión, y mutagenizar el gen clonado. El gen clonado entonces puede ser expresado y su producto ser analizado según (i) la unión a *CEACAM1*, y (ii) la generación de anticuerpos que se unan a Opa natural. Un gen mutado que produce un producto que tiene las propiedades deseadas puede ser expresado entonces *in vitro* para obtener una proteína del mutante para la invención. La proteína puede ser incorporada en composiciones, especialmente vacunas. Esta técnica es también adecuada para generar un fragmento de Opa que puede ser analizado de la misma manera según las propiedades deseadas. El gen mutado puede ser insertado en una bacteria huésped, preferiblemente una *Neisseria*, para sustituir una Opa de unión a *CEACAM1* natural.

Los transposones (Tns) son ampliamente usados para la mutagénesis cuando están disponibles. Esto es porque 1) es fácil trazar el mapa del sitio de mutación (inserción del transposón) secuenciando a partir de los extremos del transposón; 2) pueden ser usados transposones los cuales se insertan sólo una vez en el cromosoma, permitiendo el análisis de un fenotipo de mutante que es el resultado de una mutación de una sola inserción; 3) los procedimientos existentes permiten el rastreo simultáneo de grandes números de mutantes potencialmente interesantes. Otros métodos clásicos para realizar la mutagénesis incluyen el uso de luz UV y, con más frecuencia, el uso de agentes mutágenos para introducir cambios físicos en el ADN que causen la mutación de los genes. Las mutaciones introducidas por tales métodos son mucho más arbitrarias que las generadas por Tn ya que los pares de bases individuales son el objetivo (típicamente transiciones G:C -> A:T). No hay ninguna exigencia directa para los sistemas genéticos complejos, como con la mutagénesis Tn que usa estas aproximaciones, sin embargo se puede requerir que los vectores identifiquen el sitio de mutación por complementación. Típicamente se establece una curva de la dosis frente a la supervivencia para el agente, luego se usa la dosis que mata a aproximadamente el 90% de la población para asegurarse de que las mutaciones son introducidas. Se ofrece un protocolo más detallado en los Ejemplos para las mutagénesis EMS y NTG.

Es deseable para las composiciones de la invención, incluyendo las vacunas basadas en OMV, incluir a antígenos que inducirán los anticuerpos protectores que se unen a Opa *in vivo*. Por eso, los métodos de las invenciones para generar e identificar tales antígenos también incluyen típicamente las etapas de:

- (e) generar un anticuerpo frente al mutante o fragmento o variante o derivado; y
- (f) determinar si el anticuerpo también se une a una proteína Opa que se une a *CEACAM1*.

También se describe en este documento un mutante aislado o variante o fragmento o derivado o mímico de Opa, en el que el mutante o la variante o el fragmento o el derivado o mímico no se une a *CEACAM1*, preferiblemente como se obtiene de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

Existen actualmente vacunas basadas en OMV, que usan las OMV a partir de las diversas especies de *Neisseria*. Tales vacunas pueden contener la proteína Opa que se une a *CEACAM1*, aunque las consecuencias de esto hasta ahora hayan sido inapreciadas. También se describe en este documento un método de fabricación o ensayo de una vacuna, comprendiendo el método:

- (a) obtener una muestra de una vacuna o de un componente de una vacuna propuesta contra una bacteria Gram negativo; y
- (b) determinar si la muestra contiene una proteína Opa que se une a *CEACAM1*.

ES 2 310 753 T3

Así, es ahora posible seleccionar vacunas nuevas y ya existentes para determinar si el contenido de Opa las hace adecuadas o inadecuadas para su uso terapéutico. Esta información también puede ayudar en la explicación de las diferentes eficacias de las vacunas respectivas en ensayos clínicos y usos comerciales.

Un nivel máximo de Opa puede ser aceptable, y por lo tanto es opcional determinar el % en peso de la proteína Opa, si estuviera presente, el % en peso del contenido de proteína total en la vacuna o en la muestra. La vacuna o el componente pueden ser rechazados entonces si la muestra contiene la proteína Opa, o si el % en peso de la proteína Opa es superior a un nivel predeterminado, por ejemplo, el 0,5%.

La invención también se refiere al uso de (a) *Neisseria* o (b) vesículas de la membrana externa de *Neisseria* que (i) no tienen sustancialmente Opa, (ii) comprenden una proteína Opa que no se une a *CEACAM1*, (iii) comprenden un mutante o variante o fragmento o derivado de Opa que no se une a *CEACAM1*, o (iv) comprenden un antagonista que inhibe la unión de Opa a *CEACAM1*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad meningocócica o gonocócica con una mejor estimulación de la memoria inmune o una menor inhibición de la función de células T (por ejemplo, activación y/o proliferación).

La invención se aplica en particular a las OMV de bacterias Gram negativo, siendo aquellas bacterias incapaces de resistirse a la decoloración en el método de tinción Gram comúnmente conocido. Las bacterias Gram negativo se caracterizan por poseer una pared celular compleja de múltiples capas y por poseer a menudo una cápsula de polisacáridos de capa externa - por ejemplo *N. meningitidis*, aunque en algunas especies esta cápsula está ausente - por ejemplo *N. lactamica*.

Las vesículas de la membrana externa (OMV), también llamadas ampollas, son vesículas formadas o derivadas de fragmentos de la membrana externa de una bacteria Gram negativa. Las OMV típicamente comprenden proteínas de la membrana externa (OMP), lípidos, fosfolípidos, material periplásmico y lipopolisacáridos (LPS). Las bacterias Gram negativo, especialmente los patógenos como *N. meningitidis*, a menudo descargan las OMV durante las infecciones virulentas en un proceso conocido como ampollado (formación de vesículas en forma de burbujas en la membrana plasmática). Las OMV también pueden ser obtenidas a partir de bacterias Gram negativo vía diversos procesos químicos de desnaturalización conocidos. Los liposomas, que comprenden una bicapa lipídica y que incluyen típicamente un núcleo acuoso, pueden ser considerados para los objetivos de la presente invención como constituyentes de un equivalente sintético a las OMV, y las realizaciones de la invención descritas con referencia a las OMV se aplican *mutatis mutandis* a las realizaciones llevadas a cabo con y con relación a los liposomas.

Una "vacuna", según se entiende en este documento, se define como una composición farmacéutica o terapéutica usada para inocular un animal para inmunizar al animal contra una infección por un organismo, típicamente un organismo patógeno. Una vacuna comprenderá típicamente uno o varios antígenos derivados de uno o varios organismos que, con la administración a un animal, estimularán la inmunidad activa y protegerán a aquel animal contra la infección de éstos u organismos patógenos relacionados.

Las composiciones de vacuna que son formuladas como productos farmacéuticos típicamente comprenderán a un vehículo. Si están en solución o en suspensión de aerosol líquida, los vehículos adecuados pueden incluir una solución salina, solución de sacarosa, u otras soluciones tampón farmacéuticamente aceptables. Una formulación de aerosol típicamente comprenderá además un tensioactivo. De forma alternativa, las composiciones de vacuna incluyen composiciones microencapsuladas de OMV. Tales microcápsulas generalmente comprenderán una cáscara o núcleo polimérico biocompatible, tales como los hechos de polilactida-co-glucólido (PLG). Las composiciones de vacuna pueden comprender además un adyuvante, por ejemplo cuando la administración es vía una ruta parenteral. Entre los adyuvantes adecuados se incluye el hidróxido de aluminio.

Las vacunas son administradas adecuadamente a un animal vía un número de rutas. Por ejemplo, parenteralmente, por ejemplo, intramuscularmente, trans-dermalmente o vía otras rutas, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, típicamente o vía cualquier otra ruta de administración comúnmente conocida.

Ciertas proteínas pueden ser expresadas recombinantemente en bacterias Gram negativo y así permitir el enriquecimiento o la alteración del perfil antigénico de la membrana externa bacteriana. La modificación genética de un organismo de una fuente bacteriana permite así la manipulación del perfil antigénico de las OMV que se obtienen a partir de estos organismos. Cuando proteínas que no están normalmente presentes en la membrana externa bacteriana, y así en una OMV derivada de ésta, se introducen mediante técnicas de expresión recombinante, estas proteínas "no naturales" y los polipéptidos son descritos como antígenos heterólogos. Contenidos de los documentos WO-A-00/25811 y WO-A-01/09350. Así, una ventaja de las realizaciones de la invención es que la vacuna comprende las OMV en vez de los organismos vivos patógenos atenuados o muertos que pueden plantear un mayor riesgo de infección o de reacciones adversas.

Las especies Gram negativo incluyen las seleccionadas de *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*, *Porphyromonas*, *Actinobacillus*, *Borrelia*, *Serratia*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Haemophilus*, *Escherichia*, *Legionella*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Yersinia*. La invención se ocupa de *Neisseria*.

Los métodos adecuados para extraer las OMV a partir de fuentes bacterianas incluyen la extracción con desoxicolato, la extracción con Tris/HCl/EDTA, y la extracción con acetato de litio. Los protocolos para realizar tales

extracciones son descritos más detalladamente en la bibliografía. Sin embargo, será apreciado por la persona experta que prácticamente cualquier técnica química y/o física que permita la ruptura de la membrana externa de la célula bacteriana para liberar suficientes OMV para su purificación y aislamiento, es adecuada para la preparación de las composiciones de la invención.

La invención también se refiere a métodos para vacunar animales, especialmente seres humanos, contra la infección bacteriana Gram negativo que utiliza las composiciones de la invención. En particular, la invención proporciona métodos para vacunar animales contra una infección meningocócica. También se proporcionan usos de las composiciones de la invención en la vacunación de animales, incluyendo seres humanos, contra una infección meningocócica. También se describen usos de las composiciones de la invención en la fabricación de vacunas para inocular animales para estimular la inmunidad protectora frente a una infección bacteriana Gram negativo. Las OMV son de uso en composiciones administradas mucosamente, como la toxicidad LPS es menos y LPS puede funcionar como un adyuvante.

Las OMV de la invención tienen un contenido reducido, o no tienen, proteínas Opa que reconocen a la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (*CEACAM1*) y que suprimen tanto la activación como la proliferación de linfocitos T CD4⁺ de la línea celular Jurkat en respuesta a varios estímulos *in vitro* y tienen efectos similares sobre las células primarias (benignas) de un tipo similar.

Una ventaja de la invención consiste en que las OMV de los inventores evitan la presencia de Opa reactiva con *CEACAM1* y así, en comparación con las OMV que sí contienen Opa reactiva con *CEACAM1*, muestran una mejor respuesta de los linfocitos frente a estímulos activantes, una menor muerte de linfocitos, y como corolario, un mayor desarrollo de la inmunidad protectora. Esto es sorprendente, considerando la especificidad de especies de proteínas Opa de *Neisseria* con respecto al reconocimiento de los receptores, que estos efectos inmunodepresivos humanos no serían evidentes en modelos animales. Por eso las cepas de *Neisseria* deficientes en actividad de unión a *CEACAM1* son usadas en el desarrollo de vacunas basadas en OMV humanas de la invención.

Las *Neisseriaceae* patógenas y comensales son cada una capaces de expresar proteínas Opa que son, en la enorme mayoría de los casos, reconocidas por el *CEACAM1* del huésped. Los inventores han demostrado la presencia de tales proteínas en preparaciones de OMV, y además, que estas especies son capaces de interactuar con linfocitos humanos de una manera que induce la inmunodepresión.

Los inventores han notado diferencias significativas en la respuesta frente a las OMV derivadas de *N. meningitidis* (Nm), *N. lactamica* (Nl) y *N. gonorrhoeae* (Ng) tal que, en el análisis de proliferación, la inhibición mediada por las OMV de Nm era dependiente de la previa activación de los linfocitos, mientras que la exposición con las OMV de Ng reactivas con *CEACAM1* inhibió la proliferación en ausencia de la preestimulación de los linfocitos. También los inventores consideraron significativo que las OMV de Nl (seleccionadas de acuerdo con la invención para no contener Opa) no inducían la proliferación de linfocitos mientras que las OMV de Ng Opa-ve (o de otra manera no reactivas con *CEACAM1*) indujeron la proliferación en relación a los linfocitos no expuestos.

La invención también se diferencia sorprendentemente de un estudio anterior en el cual la infección con bacterias intactas (que expresaban Opa) tenía un efecto poco apreciable sobre la muerte celular. En la invención, las composiciones preparadas a partir de aquellas bacterias, por ejemplo, las OMV, sí que afectaban a la muerte celular.

De acuerdo con la invención, evitar el uso de Opa reactiva con *CEACAM1*, (en el contexto de una OMV), inhibe las funciones asociadas y tiene ventajas significativas en la eficacia protectora de todas las vacunas meningocócicas. Las vacunas de OMV (meningocócicas) disponibles en el comercio se preparan a partir de aislados clínicos y como tal son probablemente Opa⁺ en la inmensa mayoría de los casos. Además, > 95% de las variantes de Opa meningocócicas expresadas son reconocidas por *CEACAM1* y por consiguiente, es altamente probable que las preparaciones de vacuna actuales induzcan efectos inmunodepresivos por la unión de *CEACAM1*. Siguiendo la invención, se seleccionan "cepas parenterales" de la vacuna para la expresión de Opa, y en particular, para especies reactivas de *CEACAM1*. Un análisis de este tipo permite la selección de Opa(-) o, de otra manera, de aislados bacterianos no reactivos de *CEACAM1*, y por consiguiente, una potenciación relativa de la respuesta inmune frente a las OMV obtenidas a partir de estos.

Tanto el meningococo como el gonococo son estrictos patógenos humanos y, de acuerdo con esto, las variantes de Opa no reconocen al *CEACAM1* murino u otros, como ya se ha mencionado. Por consiguiente, la inmunodepresión mediada por *CEACAM1* no sería evidente en los modelos animales típicamente usados para evaluar la eficacia de las vacunas. Opa es un importante determinante de la patogenicidad de *Neisseria*, y la exclusión de esta especie puede restringir excesivamente la inmunogenicidad potencial de una vacuna basada en OMV (u otro). Por consiguiente, conforme a las realizaciones específicas de la invención, una Opa no inmunodepresiva natural, o una proteína de mutante modificada para este fin, está incluida en una composición basada en OMV. Considerando la plasticidad genética típica de *Neisseriaceae* y la disponibilidad de una secuencia del genoma meningocócico completo, puede ser usada la selección antigénica y/o la manipulación genética para manipular una preparación de OMV optimizada derivada del *Neisseriaceae* patógeno. Además, dada la naturaleza relativamente inofensiva de la especie comensal *N. lactamica* junto con las observaciones de protección heteróloga proporcionadas por las OMV de esta especie y, potencialmente, la expresión de nuevos antígenos heterólogos en este contexto, la *N. lactamica* no reactiva de *CEACAM1* (o de otra manera Opa^{-ve}) también es adecuada para una mejor vacuna de *N. meningitidis*.

ES 2 310 753 T3

La invención se ilustra a continuación con los ejemplos siguientes, que hacen referencia a los dibujos que acompañan, en los que:

La figura 1 es una micrografía por barrido electrónico que ilustra diplococos intactos y vesículas de la membrana externa aisladas (OMV);

La figura 2 muestra el modelo de expresión de Opa y las propiedades de unión de *CEACAM1* de las OMV de *Neisseria*;

La figura 3 muestra la proliferación de linfocitos T en respuesta a las OMV de *Neisseria*;

La figura 4 es un análisis de citometría de flujo FACS de la expresión de CD69 por células Jurkat; y

La figura 5 muestra la mortalidad apoptótica entre células Jurkat estimuladas con IL2 en respuesta a una exposición de 16 h usando OMV gonocócicas.

Más detalladamente, la figura 1 muestra una micrografía por barrido electrónico que ilustra diplococos intactos y vesículas de la membrana externa (OMV) aisladas. *N. meningitidis* (A), y *N. lactamica* (B) cada una tienen “ampollas” de membrana naturales estrechamente asociadas (flechas rellenas).

La figura 2 muestra el modelo de expresión de Opa y las propiedades de unión de *CEACAM1* de OMV de *Neisseria*. (A) Inmunotransferencia sondada usando el anticuerpo monoclonal específico de la proteína Opa que ilustra la presencia de una variante de Opa inmunorreactiva en las Nm-OMV, pero no en las NI-OMV comparables; y fenotipos de Opa apropiados en las OMV derivadas de cepas gonocócicas isogénicas. (B): Ensayo ELISA que cuantifica las interacciones entre las OMV de *Neisseria* (10 µg de proteína total) y *CEACAM1*-Fc soluble. Las OMV que reconocen *CEACAM1* se muestran como barras negras. En cada caso, las barras de error indican +1 SD (n=3).

La figura 3 muestra la proliferación de linfocitos T en respuesta a las OMV de *Neisseria*. Fueron cultivados linfocitos T de Jurkat en presencia de 10.000 U/IL2 y/o 1 µg de Ig anti_CD3ε y después fueron expuestos usando las OMV derivadas de *N. meningitidis* (Nm), o de *N. lactamica* (NI) (A); o *N. gonorrhoeae* que expresaba las variantes definidas de Opa (B). Se muestra la exposición con las OMV reactivas de *CEACAM1* como barras negras. En cada caso, las barras de error indican +1 SD (n=6). El análisis estadístico de estos datos indica que los datos de NL y NM se diferencian con un intervalo de confianza de $p < 0,010$ coincidente con la preestimulación de linfocitos y $p=0,06$ en ausencia de la preestimulación. La interrogación similar de los datos de OMV gonocócicas demostró que los datos de la exposición de Opa₅₂ se diferencian de los datos de exposición comparables con un intervalo de confianza de $p < 0,0002$.

La figura 4 es un análisis FACS de la expresión de CD69 por células Jurkat. Fueron preestimuladas poblaciones de células emparejadas como se indica (usando 10.000 U/IL2 y/o 1 µg de Ig anti_CD3ε) y fueron expuestas con las OMV derivadas de *N. meningitidis* (Nm) o *N. lactamica* (NI), (A), o usando las OMV derivadas de *N. gonorrhoeae*, que expresaban las variantes de Opa definidas (B). En cada caso, las barras de error indican +1 SD (n=3 grupos de 1×10^5 acontecimientos). El análisis estadístico estableció que los datos de Nm y NI se diferenciaban con un intervalo de confianza en los límites de $p=0,01$ a $p < 0,0001$ siendo las diferencias más fuertes evidentes en los linfocitos no estimulados, o los preestimulados con IL-2 e Ig anti_CD3ε. Los datos de exposición de Opa₅₂ se diferenciaron de los datos comparables con intervalos de confianza en los límites de $p=0,0037$ - $p < 0,0001$.

La figura 5 muestra la mortalidad apoptótica entre células Jurkat estimuladas con IL2 en respuesta a una exposición de 16 h usando OMV gonocócicas. La exposición de OMV causó un aumento dependiente de la dosis de la apoptosis con los efectos más grandes coincidentes con una exposición usando OMV de Opa₅₂ que reaccionaba con *CEACAM1*. La exposición usando las OMV de Opa₅₀ tenía un efecto intermedio, y la exposición usando las OMV de Opa(-) tenía un efecto mínimo sobre los niveles de apoptosis. En cada caso, estos datos son representativos de 1×10^6 linfocitos estudiados por citometría de flujo. Los datos son representativos de tres experimentos.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Líneas celulares y técnicas de cultivo de tejido

Previamente se han descrito linfocitos T (CD4⁺) humanos de Jurkat (ATCC N°. CRL-10915) {Nagasawa, Howatson, *et al.* 1981 ID:2798} y fueron mantenidos rutinariamente en medio RPMI 1640 (Invitrogen; Burlington, Ontario) suplementado con suero bovino fetal inactivado con calor al 10% y GlutaMAX 4 mM (Invitrogen), denominado RPMI-G. Las células fueron cultivadas a 37°C en aire humedecido con 5% de CO₂. Cuando fue apropiado, las células Jurkat fueron estimuladas durante 48 h usando las concentraciones indicadas de IL-2 humano recombinante (Pharmingen; Mississauga, Ontario) antes de la exposición a OMV. Las exposiciones de este tipo fueron llevadas a cabo en RPMI-G suplementado con 5 U/ml de benzonasa endonucleasa (Sigma; Oakville, Ontario) y solución salina tamponada de fosfato al 5% (v/v) (pH 7,4; PBS) con MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 0,5 mM (denominado PBS/Mg/Ca). En algunos casos, la estimulación vía el receptor de células T fue inducida por la exposición al anticuerpo monoclonal

UCHT1 específico de CD3ε humano (Pharmingen), que posteriormente fue reticulado usando los fragmentos Fab₂ de IgG antiratón de oveja (Sigma; 3 µg/ml).

Fueron mantenidas células COS-7 de riñón de mono verde africano (ATCC N. CLR-1651) en DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS inactivado con calor al 10% (Cansera; Etobicoke, Ontario), 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina, glutamax 1 mM, piruvato de sodio 1 mM y aminoácidos no esenciales 1 mM (Invitrogen) a 37°C en aire humedecido al 5% de CO₂.

Cepas bacterianas

Fueron obtenidos aislados de la cepa de *Neisseria meningitidis* K454 y la cepa de *Neisseria lactamica* Y92 1009 de la Unidad de Referencia Meningocócica, Manchester, Reino Unido. Se han descrito previamente cepas gonocócicas que expresaban constitutivamente variantes de Opa específicas de la cepa de *N. gonorrhoeae* MS11, y fueron proporcionadas generosamente por el Doctor T. F. Meyer (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlín, Alemania). Fueron expresadas las variantes de Opa en el fondo de la cepa de MS11 N279 que no expresa pilin y tiene una delección en el *locus* de OpaC₃₀ que codifica la única variante de Opa específica del receptor de HSPG de esta cepa. Fueron cultivadas *N. meningitidis* y *N. lactamica* a partir de soluciones madres congeladas en Agar de Mueller Hinton (Laboratorios Difco; West Molesey, Surrey, Reino Unido) y fueron cultivadas cepas de *N. gonorrhoeae* a partir de soluciones madres congeladas en agar GC (Difco; Oakville, Ontario), suplementado con enriquecimiento Iso VitaleX[®] al % 1 (v/v) (BBL[®]; Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Todas las cepas bacterianas fueron cultivadas a 37°C en aire humedecido al 5% de CO₂ y fueron subcultivadas diariamente, usando un microscopio binocular para controlar el fenotipo de Opa. La expresión de Opa y la variante-tipo fueron confirmadas rutinariamente por SDS-PAGE (10%) con proteínas resueltas teñidas tanto usando Azul de Coomassie brillante como sometidas a análisis por inmunotransferencia usando el anticuerpo monoclonal específico de Opa 4B12/C11, que reacciona con todas las variantes de Opa conocidas y que fue proporcionado generosamente por el Doctor M. Achtman (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlín, Alemania).

Preparación y caracterización física de las OMV

Fueron preparadas OMV a partir de aislados de *N. meningitidis* y *N. lactamica*. Fueron preparados cultivos líquidos de una noche en medio de Franz, y fueron granulados por centrifugación a 1000 x g. Las bacterias fueron resuspendidas en tampón de OMV que contenía NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,01 M (pH 7,5). Después fueron calentadas las suspensiones bacterianas a 56°C durante 30 minutos, y los extractos resultantes fueron clarificados entonces por centrifugación a 25.000 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes recuperados fueron centrifugados a aprox. 100.000 x g durante 2 h. El pelete final que contenía OMV fue lavado dos veces, resuspendido en PBS y almacenado a -80°C.

Fueron preparadas las OMV gonocócicas a partir de cepas gonocócicas recombinantes con los fenotipos de Opa definidos. Las bacterias fueron pasadas de la noche a la mañana en medio sólido (como se describe anteriormente), y fueron preparados cultivos cerca de la fase líquida estacionaria en una infusión cerebro-corazón modificada (Difco) que contenía LiCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, Hepes 50 mM, D-glucosa al 1% (pH 7,2), fueron cultivados a 37°C en aire humedecido al 5% de CO₂ con agitación rápida. A partir de esto, fue seguida la incubación durante 2 h más a 40°C con agitación rápida. Las bacterias fueron eliminadas por centrifugación a 1000 x g durante 20 minutos, y fueron resuspendidas en PBS que contenía sarkosyl al 0,05% (p:v) (Bioshop Canadá, Inc; Burlington, Ontario) y desoxicolato de sodio al 0,05% (p:v) (Bioshop Canadá, Inc). Las células resuspendidas fueron incubadas a 56°C durante 30 minutos con mezcla suave y luego fueron enfriadas con hielo. Después fueron extraídas las suspensiones bacterianas usando un homogeneizador Wheaton y entonces fueron sonicadas en hielo (5 x 10 s pulsos). Los extractos fueron clarificados por centrifugación a 25.000 x g durante 20 minutos, y el sobrenadante resultante fue centrifugado a 100.000 x g durante 2 h. El pelete final, que contenía OMV, fue lavado dos veces, fue resuspendido en PBS, fue extruido a través de un filtro de jeringuilla de 0,22 µm, y fue almacenado a -80°C. La esterilidad de OMV fue analizada por inoculación en agar GC y la incubación fue como se describe anteriormente. La distribución por tamaños de las OMV fue determinada tanto por microscopía de barrido electrónico (OMV de *N. lactamica* y *N. meningitidis*) como por análisis FACS comparativo (OMV gonocócicas). Las estimaciones de la superficie específica relativa fueron calculadas basado en la relación $S=4\pi r^2$ en la que S representa la superficie específica de una esfera, y r representa el radio de aquella esfera.

Construcción y expresión de proteínas de fusión CEACAM1-Fc

Un vector de expresión que codifica el dominio amino terminal de CEACAM1 fusionado a la parte de Fc de IgG1 humana fue generosamente proporcionado por los doctores O. Mandelboim y G. Markel (Facultad de medicina de Hadassah, Jerusalén, Israel). La proteína CEACAM1-Fc recombinante fue expresada en células COS-7 que fueron transitoriamente transfectadas usando el reactivo FuGENE6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana, EE.UU.) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El sobrenadante del cultivo celular fue recuperado 48-72 h después de las transfecciones y fue clarificado por centrifugación a 1000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante clarificado entonces fue filtrado usando un sistema de filtración desechable accionado por vacío (Stericup 0,22 µm, Millipore; Nepean, Ontario), y fue concentrado usando un concentrador de ultrafiltración de polietersulfona de 10 kDa de tamaño de poro (Millipore). La proteína de fusión fue entonces purificada usando Proteína A-Sepharose (Sigma). La elución a partir de esta matriz fue realizada usando glicina 0,2 M/HCl (pH 2,5), siendo recuperadas las alícuotas directamente en tubos de recolección que contenían 100 µl de Tris 1 M (pH 9,0) para neutralizar las muestras. El eluato

purificado fue dializado contra PBS a 4°C y luego fue concentrado a menos de 1 mL con filtros centrífugos Ultrafree Biomax (Millipore). La función del receptor y la especificidad de las fusiones *CEACAM1*-Fc fueron evaluadas por asociación con cepas gonocócicas isogénicas que poseían variantes específicas de la proteína Opa.

5 *Determinación de la especificidad del receptor de Opa*

Las interacciones entre las variantes de Opa y *CEACAM1* fueron caracterizadas por ELISA. Al principio, el contenido de proteína de cada preparación de OMV fue determinado usando el sistema de ensayo BCA (compañía química Pierce, Rockford, Illinois), y las muestras que contenían una cantidad igual de proteína total fueron inmovilizadas en placas de microtítulo de 96 pocillos (Corporación Coming; Midland Mich., EE.UU.). Cada OMV fue aplicada por triplicado en diluciones en serie dobles, y luego fueron expuestas a una concentración estándar de la proteína de fusión *CEACAM1*-Fc. La proteína unida fue detectada usando proteína A-peroxidasa de rábano picante conjugada, y fue visualizada usando el sistema colorimétrico OPD (Sigma). La señal asociada a OPD fue cuantificada por análisis espectrofotométrico a 450 nm.

15 *Análisis citométricos*

La activación de Jurkat fue evaluada cuantificando la expresión del marcador de activación CD69 de células T bien caracterizado. Las células fueron infectadas y/o expuestas como se describe anteriormente, y después de 16 h las muestras fueron sondadas usando el anticuerpo monoclonal antihumano de CD69 (clon FN50) conjugado a alofococianina (Pharmacia; Mississauga, Ontario). Las células entonces fueron fijadas en paraformaldehído (3,7%) y la fluorescencia asociada a CD69 fue evaluada usando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Oakville, Ontario). La muerte celular fue caracterizada y cuantificada usando el kit de tinción de Annexin-V-FLUOS/yoduro de propidio (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec), permitiendo así la comparación proporcional de poblaciones vivas, apoptóticas y necróticas por citometría de flujo.

25 *Análisis de proliferación de linfocitos*

Fueron expuestos cultivos de células Jurkat paralelos, equiparados por densidades, en RPMI-G+ 5% PBS/Mg/Ca usando las OMV a la concentración indicada. Fue añadida gentamicina (100 µg/mL; Bioshop) 2 h después del comienzo de la infección y fue mantenida en todas partes del período de incubación subsecuente para prevenir un crecimiento bacteriano excesivo. Algunas células fueron cultivadas en presencia de 10.00 U de IL-2 humano recombinante (Pharmingen) y la estimulación vía el receptor de células T fue inducida por la exposición a 1 µg/mL de IgG de CD3ε antihumano de ratón (clon UCHT1; Pharmingen). La proliferación de Jurkat fue evaluada por el recuento directo usando un hemocitómetro doble de Levy 72 h después de la infección. En cada caso, la proliferación fue evaluada usando un modelo de recuento estandarizado y no menos de seis campos fueron contados por cada muestra.

35 *Resultados*

Proteína Opa presentada por las OMV de Neisseria. La especie *Neisseria* naturalmente sobreproduce, evagina y libera vesículas de la membrana externa (OMV) o “ampollas” (figura 1A-B). Las OMV obtenidas a partir de *N. meningitidis* (Nm-OMV) y *N. lactamica* (NI-OMV) están siendo evaluadas actualmente según su eficacia como una vacuna que proporciona protección contra enfermedades meningocócicas. Las OMV también fueron preparadas a partir de cepas isogénicas de *N. gonorrhoeae* que expresaban variantes de Opa bien definidas, incluyendo la cepa (Opa⁻) transparente N302, N303 que expresa el receptor de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG)-específico de Opa₅₀, y N309 que expresa CEACAM-específica de Opa₅₂. Las OMV gonocócicas (Ng-OMV) tenían un tamaño similar a los de las preparaciones de vacuna, como se determina por el análisis citométrico de flujo comparativo (datos no mostrados).

Las cantidades equivalentes de cada OMV, según se determinan por el contenido de proteína, fueron caracterizadas aproximadamente en SDS-PAGE (datos no mostrados). De acuerdo con la fase y la variabilidad antigénica de proteínas de la membrana externa de *Neisseria* {Nassif, Pujol, *et al.* 1999 ID: 2839}, una considerable variación fue evidente entre las diversas preparaciones (datos no mostrados). Las inmunotransferencias sondadas usando el anticuerpo monoclonal (mAb) específico de Opa que reacciona inespecíficamente con todas las variantes de Opa conocidas ilustraron la presencia de una variante de Opa sola en las Nm-OMV, mientras que ninguna fue apreciable en la preparación de NI-OMV (figura 2A). Fueron confirmados los fenotipos de Opa apropiados en las OMV derivadas a partir de las cepas gonocócicas recombinantes (figura 2A). Las OMV que no contenían Opa reactiva con *CEACAM1* y las NI-OMV sin Opa fueron por lo tanto seleccionadas como adecuadas para la invención y fueron comparadas con las Nm-OMV que contenían Opa. Cuando se expresaban, las variantes de Opa estaban presentes en concentraciones comparables, indicando que no había ninguna diferencias importantes con respecto a la densidad de proteínas Opa por unidad de proteína OMV.

Fueron expuestas cantidades iguales de las OMV a las proteínas de fusión solubles *CEACAM1*-Fc en un ensayo ELISA. Este análisis indicó que las Nm-OMV de Opa⁺, y las derivadas de gonococos que expresaban Opa₅₂ se unieron a la fusión *CEACAM1*-Fc soluble a niveles considerablemente ($p < 0,0001$) mayores que tanto las NI-OMV, que carecen de proteínas Opa, o las derivadas de gonococos que expresaban (Opa⁻) transparente u Opa₅₀. Esto indicó que la función de unión específica de *CEACAM1* de Opa₅₂ gonocócica fue mantenida en las preparaciones de OMV, y fue demostrado que la variante de proteína Opa presente en las Nm-OMV reconoce a *CEACAM1*. Las diferencias en el

reconocimiento del receptor permanecieron significativas con concentraciones de proteína OMV en el intervalo de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ (figura 3 y datos no mostrados).

Las OMV específicas de CEACAM inhibieron la activación de linfocitos. Previamente, los inventores habían observado que los gonococos que expresaban las variantes de Opa específicas de *CEACAM1* suprimían la proliferación de células T CD4^+ como respuesta a estímulos activantes. Considerando que las Nm-OMV se diferenciaban de las NI-OMV respecto al fenotipo de Opa (figura 2A), y la unión de *CEACAM1* (figura 2B), los inventores analizaron si había alguna diferencia en la respuesta de los linfocitos respecto a estas preparaciones de vacuna estándar. El grado del efecto inhibitorio fue determinado por la presencia de una variante de Opa de unión a *CEACAM1*, y además, estaba influido por el tipo de estimulación aplicada a los linfocitos. Una pequeña diferencia en el crecimiento del cultivo celular ($p < 0,06$) fue evidente cuando fueron aplicadas NI-OMV y Nm-OMV a células T CD4^+ de Jurkat no estimuladas. Sin embargo, cuando fueron estimulados linfocitos usando citoquina IL-2 y/o unión del receptor de células T antes de la exposición de OMV, las diferencias asociadas a Opa aumentaron en importancia ($p < 0,01$) (figura 3A). Para confirmar que la unión de *CEACAM1* era suficiente para conferir este efecto inhibitorio, los inventores compararon el efecto de las OMV derivadas de cepas gonocócicas isogénicas que expresaban las variantes de Opa definidas con distintas especificidades del receptor. En contraste con los efectos observados después de la exposición usando las NI- o Nm-OMV, la exposición usando las OMV que contenían Opa^- o Opa_{50} estimularon la proliferación de linfocitos T CD4^+ primarios. Esto es compatible con observaciones anteriores hechas usando bacterias intactas (en vez de las OMV) como la especie de exposición. Sin embargo, las OMV que expresaban Opa_{52} suprimieron potentemente la proliferación de células Jurkat (figura 3B), confirmando que esta variante de Opa específica de *CEACAM1* conserva tanto su unión del receptor como sus funciones co-inhibitorias en este contexto.

La menor proliferación de linfocitos podría ser el resultado de una velocidad más lenta de división celular entre la población entera y/o una reducción de la proporción de células que se estimulan para dividirse. Para determinar la proporción de células que se vuelven activadas en presencia de la diversas preparaciones de OMV, los inventores cuantificaron la expresión del marcador de activación CD69 por células T de Jurkat. Las poblaciones de linfocitos equiparadas por densidades paralelas fueron preestimuladas, y luego fueron expuestas con las diversas preparaciones de OMV. La exposición a las OMV reactivas de *CEACAM1* redujo coherentemente la proporción de linfocitos que expresaban CD69 (Fig. 4A y B). En el caso de las dos preparaciones de vacuna, el número de células Jurkat activadas en respuesta a las Nm-OMV fue coherentemente inferior que las observadas con NI-OMV, y fueron tanto comparables (muestras no estimuladas y que contienen anti-CD3 ϵ) como menores (muestras que contienen anti-CD3 ϵ) que las muestras paralelas no expuestas a las OMV (figura 4A). La exposición con las OMV gonocócicas (figura 4B) demostró un modelo consistente de la activación celular tal que, en todas las condiciones analizadas, la presencia de las OMV que contenían la Opa_{52} específica de *CEACAM1* era coincidente con la menor activación celular. Sin embargo, en este caso, los niveles de activación fueron ligeramente reducidos por la exposición a las OMV de Opa^+ (independientemente de la especificidad del receptor) pero fueron, en todos los casos, considerablemente más inhibidos por la exposición a OMV reactivas con *CEACAM1* ($p < 0,001$).

Las OMV de Neisseria inducen la apoptosis en células Jurkat. Para cuantificar y comparar directamente la influencia de la expresión de proteína Opa sobre la muerte celular, los inventores monitorizaron la apoptosis y la necrosis en cultivos de células Jurkat expuestos a varias diluciones de OMV gonocócicas (figura 5). Mientras que la necrosis celular estaba coherentemente por debajo del 5% independientemente de las condiciones de exposición (datos no mostrados), los inventores observaron un aumento dependiente de la dosis de la apoptosis en respuesta a las tres preparaciones de OMV. La apoptosis era claramente más alta como respuesta a las OMV que contienen proteínas Opa, sugiriendo que la mayor parte de la muerte celular estaba en correlación con la unión de las OMV a la superficie de los linfocitos. Las OMV que contenían Opa_{52} inducían una mayor apoptosis que las que contenían Opa_{50} , indicando que alguna parte de este efecto estaba dictado por los efectos específicos del receptor. Estos resultados contrastan con aquellos en los cuales fueron usados gonococos intactos como la especie de exposición, ya que los inventores no habían observado ninguna inducción significativa tanto de la apoptosis como de la necrosis como respuesta a la infección por bacterias que expresaban (Opa^-) transparentes, Opa_{50} u Opa_{52} .

Ejemplo 2

Protocolo de mutagénesis EMS

El protocolo fue como sigue:

Se cultiva *N. meningitidis* a una densidad óptica de 600 nm (OD_{600}) de 0,7 en medio Franz. Se transfieren 6 ml a un tubo cónico de 15 ml; se centrifuga durante 5 minutos a $2.000 \times g$.

Se lavan a las células dos veces con 10 ml de tampón de mutagénesis de metanosulfonato de etilo (EMS).

Se resuspende el pelete de células lavado en 12 ml del tampón de mutagénesis EMS.

Se distribuye la suspensión celular en cuatro alícuotas de 2,4 ml en tubos cónicos de 15 ml. En una campana de extracción, se añaden 62,5 μl de EMS (número de catálogo Sigma M0880) a cada alícuota de la suspensión celular preparada y se mezcla fondo (a EMS le lleva un rato diluirse).

ES 2 310 753 T3

Se incuban las muestras durante 0, 1, 1,25 y 1,5 h a 37°C, lo que debería dar lugar a una supervivencia de aproximadamente 100, 80, 50 y 20%, respectivamente.

5 Para tratar las muestras se añaden 10 ml de solución de parada de EMS; se centrifugan las células: se lavan una vez con 10 ml de solución de parada de EMS; se lavan las células una vez con 10 ml de medio; se suspende de nuevo el pelete lavado en 2,5 ml de medio y se almacena la suspensión celular a 4°C.

10 Para determinar el título de células viables de las muestras mutadas, se sonica cada muestra cinco veces con un sonicador Braun Sonic U puesto a B070. Se diluyen en serie y se ponen en placas por triplicado en un medio selectivo. Se incuban las placas a 37°C.

15 Para sacar de las placas las células mutadas para las colonias individuales, se filtra cada muestra sonicada a través de filtros de poro 5 mm. La etapa de filtración es necesaria para obtener una buena suspensión de células individuales; sin embargo aproximadamente el 95% de las células totales se pierde durante la filtración debido a la eliminación de grupos de células. Se diluyen las muestras filtradas en serie y se ponen en placas en medio selectivo. Se incuban las placas a 37°C.

20 Se rastrean las colonias para detectar las bacterias que expresan las proteínas Opa no reactivas con *CEACAM1*. Posteriormente se rastrean tales proteínas Opa que inducen los anticuerpos que se unen a la Opa reactiva con *CEACAM1* natural.

Tampón de mutagénesis EMS

25 4,23 ml de NaH₂PO₄ 1M
5,77 ml de Na₂HPO₄ 1M
0,5 ml de Tween 80 al 20%
30 H₂O hasta 100 ml

Solución de parada EMS

35 Tiosulfato de sodio al 5%, Tween 80 al 0,1%, filtro esterilizado, 100 ml (*recién preparado*)

Ejemplo 3

Mutagénesis NTG

40 El protocolo es como sigue:

Se cultiva *N. meningitidis* a una densidad óptica de 600 nm (OD₆₀₀) de 0,8 en medio Franz. Se transfieren 50 ml a un tubo cónico de 50 ml; se centrifuga durante 15 minutos a 2.000 g.

45 Se desecha el sobrenadante y se suspende de nuevo el pelete en 5 ml de medio.

Se pone una alícuota de 1 ml de células en tubos individuales de 15 ml de fondo redondo (Nº. de Cat. Falcon 2059) y se añade nitrosoguanidina (NTG) a un intervalo de concentraciones finales de 0 a 1.000 mg/ml.

50 Se incuba la suspensión celular a 37°C con agitación durante 1 h.

Se lava cada alícuota de células dos veces con 10 ml de medio y finalmente se suspende de nuevo el pelete en 1 ml de medio.

55 Se hacen diluciones sucesivas de cada reacción y se ponen en una placa por duplicado para conseguir los recuentos de colonia para la determinación de la curva de mortalidad.

Se repite la mutagénesis con la concentración de NTG que proporciona una mortalidad del 90% en las condiciones anteriores.

60 Se rastrean las colonias para detectar las bacterias que expresan proteínas Opa no reactivas con *CEACAM1*. Posteriormente se rastrean tales proteínas Opa que inducen los anticuerpos que se unen a Opa reactiva con *CEACAM1* natural.

65

Ejemplo 4

Generación de un mutante transgénico que no expresa Opa

5 Existen múltiples tecnologías con las que mutar la expresión de variantes de proteína Opa a partir de los tres o cuatro alelos de Opa presentes en *N. meningitidis* (o alelos similares en otra *Neisseria* y/u otras bacterias). Brevemente, los alelos de Opa son clonados en virtud de las regiones altamente conservadas, en regiones no codificantes adyacentes a regiones que codifican el propio péptido Opa. Los genes clonados de este modo se insertan en un vector del plásmido adecuado y se mutan usando la inserción del transposón, u otras técnicas de biología molecular estándar (las técnicas
10 adecuadas se describen en Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989, Comelissen *et al.*, 1992; Comelissen y Sparling 1996, y Boulton *et al.*, 2000).

Ejemplo 5

15 *Generación de un fragmento de Opa que no se une a CEACAM1*

Opa se expresa tanto en el contexto de un organismo natural (es decir una *Neisseria* sp.) o se sobreexpresa una variante de Opa recombinante individual clonada en un contexto heterólogo. En uno u otro caso, la Opa intacta se purifica a partir de lisados de células enteras bacterianas, membranas bacterianas purificadas o a partir de cuerpos de
20 inclusión, usando técnicas bioquímicas y/o biofísicas estándar, incluyendo la cromatografía de afinidad y/o la filtración por selección y/o la cromatografía de infiltración de gel y/o la cromatografía de intercambio iónico.

La Opa purificada entonces se fracciona mediante digestión proteolítica usando tripsina, quimotripsina, subtilisina y/o otras enzimas proteolíticas y/u otros tratamientos químicos. Los fragmentos de Opa producidos de este modo son seleccionados según la ausencia de la unión de *CEACAM1*, por cromatografía de afinidad, usando la proteína de
25 fusión extremo N-terminal de *CEACAM1*-Fc descrita en este documento, (es decir, por selección de los fragmentos de proteína que fallan al unirse a esta proteína de fusión). Los fragmentos de este tipo se usan como antígeno en un sistema animal adecuado, en presencia de una preparación de adyuvante, y opcionalmente se conjugan a una proteína vehículo adecuada. El suero preparado de este modo se analiza frente a variantes de Opa intactas por análisis de inmunotransferencia, y/o transferencia en mancha de células enteras, y/o análisis citométrico, y/u otros ensayos de
30 reactividad. De forma alternativa, una serie de péptidos específicos de Opa sobrelapantes se sintetiza *de novo* usando técnicas estándar (Gausepohl *et al.*, 1992), o se expresa de otra manera a partir de secuencias de ácidos nucleicos recombinantes clonadas que codifican regiones específicas de Opa. En cada caso, los péptidos generados (usando una o ambas técnicas) son seleccionados según la unión de *CEACAM1* de acuerdo con métodos que los inventores han
35 definido previamente, y que posteriormente, pueden usarse como antígenos como se ha descrito.

Ejemplo 6

Generación de variantes de Opa no reactivas con CEACAM1

40 Diversas variantes de Opa gonocócicas naturales no tienen actividad de unión de *CEACAM1*, (Gray-Owen *et al.*, 1997) y han sido evaluadas en términos de sus efectos inmunomoduladores. También se establece que, de las cuatro variantes de Opa meningocócicas naturales, al menos una variante está desprovista de modo similar de actividad de unión de *CEACAM1* (Meutmer *et al.*, 2000), y, además, la *Neisseria* sp. comensal expresa variantes de Opa que no reconocen a *CEACAM1* (Toleman, Aho y Virji, 2001).

45 Un cultivo bacteriano dado se rastrea para detectar la expresión de Opa y la reactividad de *CEACAM1* (o su ausencia), y los resultados se usan para seleccionar un fenotipo que no sea reactivo con *CEACAM1*. La expresión de Opa es variable en fase, y por lo tanto se prefiere que este procedimiento de selección sea realizado en una base rutinaria. El rastreo se realiza adecuadamente antes de la purificación de OMV. También puede ser realizado en preparaciones de
50 OMV a partir de bacterias Gram negativo.

De forma alternativa, una bacteria (preferiblemente una cepa de *Neisseria*) es construida de modo que sea capaz de expresar una Opa sola del fenotipo definido y con la especificidad del receptor. Esto se logra sustituyendo un alelo de Opa no funcional (es decir, mutado), en el cromosoma bacteriano con una secuencia de Opa natural (es decir, no
55 mutada). De forma alternativa, se clona Opa en serie con uno de los diversos sistemas de regulación génicos bacterianos bien caracterizados; la expresión de Opa entonces se controla por la manipulación de las condiciones del cultivo.

La invención proporciona así microorganismos, composiciones, vacunas, componentes de vacunas, métodos para obtener los anteriormente mencionados y genes que codifican los anteriormente mencionados, sustancialmente sin
60 Opa que se una a *CEACAM1*. Estos son adecuados para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad causada por bacterias Gram negativo, especialmente *Neisseria*.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una composición que comprende vesículas de la membrana externa de *Neisseria* que contienen Opa que no se une a *CEACAM1* y que no tienen sustancialmente Opa que se une a *CEACAM1* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o la prevención de una enfermedad meningocócica, en el que las vesículas de la membrana externa sonde *Neisseria* que ha sido modificada por mutación para expresar una Opa que no se une a *CEACAM1*.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento mejora la estimulación de la memoria inmune o reduce la inhibición de la función de células T.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha *Neisseria* es *Neisseria meningitidis*.
- 15 4. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la mutación es por mutagénesis del transposón, luz UV, mutagénesis EMS o mutagénesis NTG.
5. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el medicamento es para administración parenteral, intramuscular, transdérmica, intranasal, oral, tópica o mucosa.
- 20 6. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que las vesículas de la membrana externa comprenden un antígeno heterólogo.
7. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la composición comprende a un vehículo.
- 25 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el vehículo es una solución salina, solución de sacarosa, o una solución tampón farmacéutica aceptable.
9. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la composición comprende un tensioactivo.
- 30 10. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicha composición comprende un adyuvante.
11. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicha composición comprende vesículas de la membrana externa microencapsuladas.
- 35 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las vesículas de la membrana externa microencapsuladas comprenden una carcasa o núcleo polimérico biocompatible.
- 40 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la carcasa o núcleo polimérico biocompatible está hecho de polilactida-co-glicólido.
14. Un método para fabricar un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad meningocócica, comprendiendo el método:- 45 (a) obtener una *Neisseria*;
- (b) determinar si la *Neisseria* expresa una proteína Opa que se une a *CEACAM1*;
- (c) si la *Neisseria* expresa una proteína Opa que se une a *CEACAM1*, desechar la *Neisseria* y repetir las etapas (a) a (c);
- 50 (d) conservar la *Neisseria* si ésta expresa a un mutante o variante o fragmento o derivado de Opa, en el que el mutante o la variante o el fragmento o el derivado no se une a *CEACAM1*;
- 55 (e) generar un anticuerpo frente al mutante o fragmento o derivado;
- (f) determinar si el anticuerpo también se une a una proteína Opa que se une a *CEACAM1*; y
- (g) preparar una composición que comprenda la *Neisseria* conservada de la etapa (d).
- 60
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho mutante o variante o fragmento o derivado es asequible al:- 65 (i) obtener una *Neisseria*;
- (ii) llevar a cabo la mutagénesis en la *Neisseria*;

ES 2 310 753 T3

(iii) determinar si la *Neisseria* expresa un mutante o fragmento o variante o derivado de una proteína Opa que no se une a *CEACAM1*;

(iv) aislar el mutante o la variante o fragmento o derivado, en el que el mutante o variante o fragmento o derivado no se une a *CEACAM1*.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicha mutagénesis es mediante mutagénesis de transposón, luz UV, mutagénesis EMS o mutagénesis NTG.

17. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que dicha determinación comprende exponer dicha proteína Opa a una proteína de fusión *CEACAM1-Fc* en un ensayo ELISA.

18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha determinación comprende además poner en contacto dicha proteína Opa con un anticuerpo monoclonal específico de Opa.

19. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que dicha determinación comprende **caracterizar** la interacción entre dicha proteína Opa y *CEACAM1* mediante ELISA.

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende además:

(v) generar un anticuerpo frente al mutante o fragmento o variante o derivado o mímico; y

(vi) determinar si el anticuerpo también se une a una proteína Opa que se une a *CEACAM1*.

21. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, en el que la bacteria es *Neisseria meningitidis*.

22. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, que comprende preparar una vesícula de la membrana externa de la bacteria conservada.

Figura 1

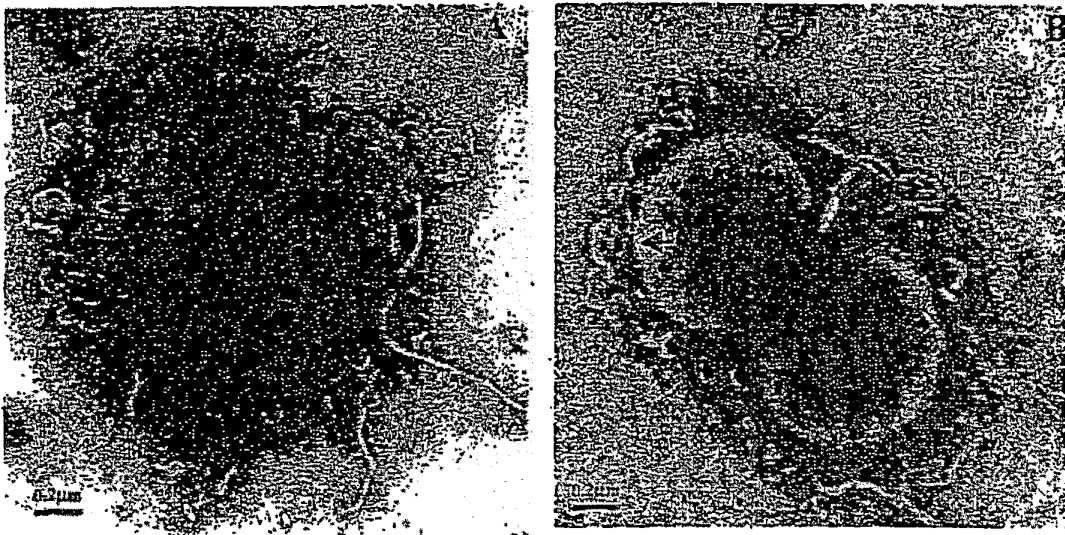


Figura 2

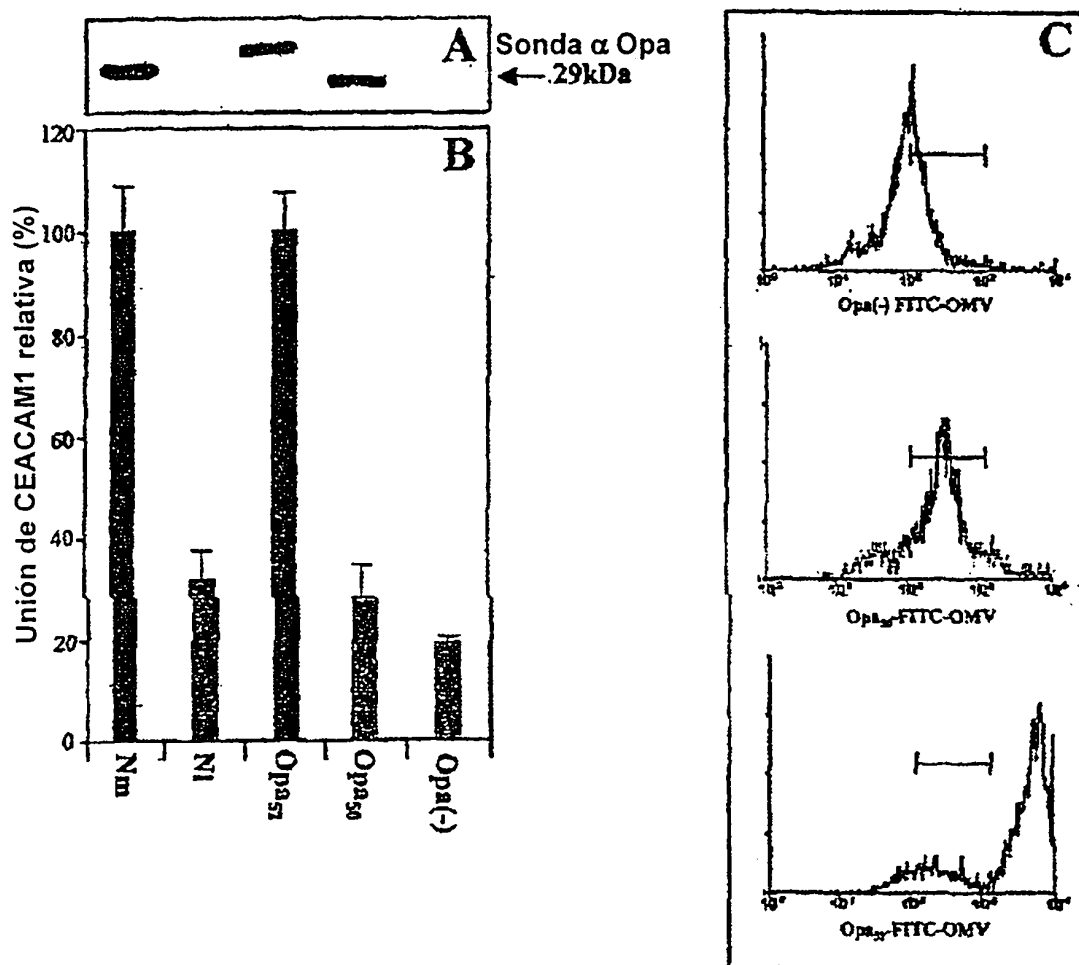


Figura 3

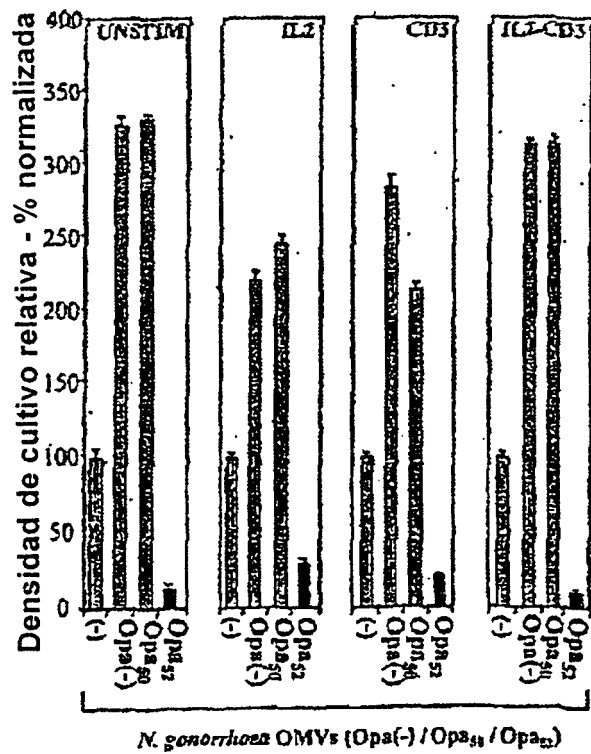
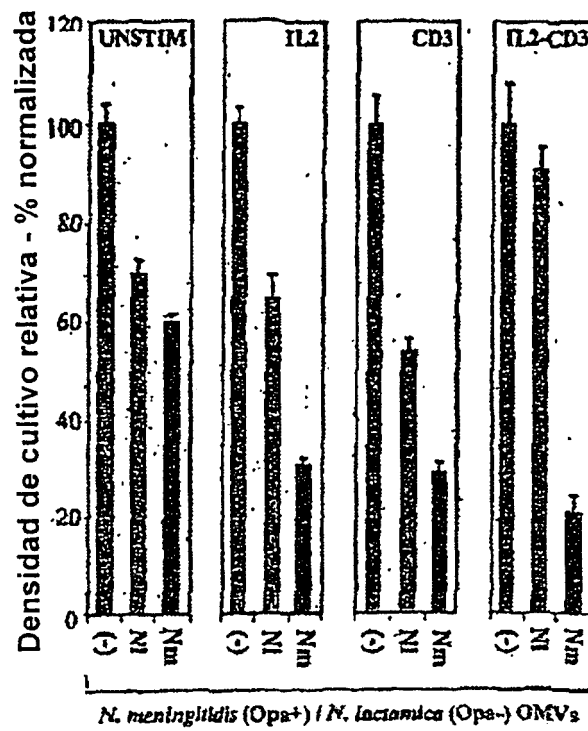


Figura 4

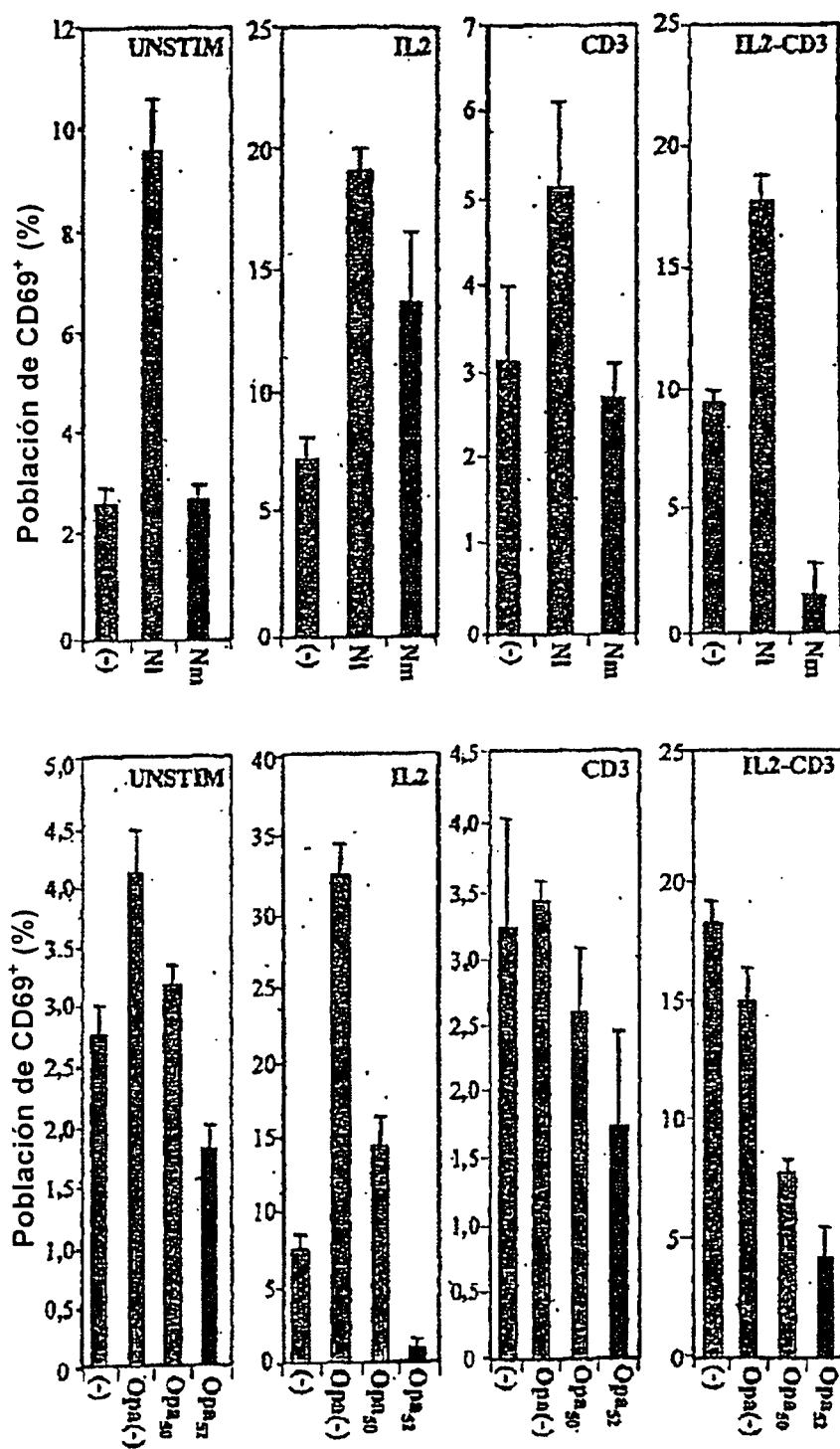


Figura 5

