

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 559**

21 Número de solicitud: 201431336

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

15.09.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.05.2015

Fecha de la concesión:

26.10.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.11.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ BARREIRO, Alejandro;
SEIJO REY, Begoña;
PENSADO LÓPEZ, Andrea;
SÁNCHEZ POZA, María Sandra ;
FREIXEIRO DÍAZ, Paula;
CRIADO ÁLVAREZ, María Teresa y
FERREIRÓS DOMÍNGUEZ, Carlos María Ignacio**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Composición inmunogénica de nanopartículas que comprende el potenciador de la infectividad a macrófagos (MIP)**

57 Resumen:

Composición inmunogénica de nanopartículas que comprende la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP). La presente invención se refiere a composiciones novedosas, y en particular, a composiciones inmunogénicas novedosas, que comprenden la proteína (MIP), y al uso de dichas composiciones para provocar una respuesta inmune. En este sentido, los autores de la presente invención han encontrado que sorprendentemente las nanopartículas que principalmente comprenden ésteres de sorbitán son particularmente adecuadas como vehículo para composiciones vacunales que comprenden la proteína MIP para uso en la prevención de la infección causada por N. meningitidis.

ES 2 535 559 B2

DESCRIPCIÓN

Composición inmunogénica de nanopartículas que comprende el potenciador de la infectividad a macrófagos (MIP)**Sector de la técnica**

5

La presente invención se refiere al campo médico, en particular a nuevas composiciones inmunogénicas, que comprenden la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP), y el uso de dichas composiciones para provocar una respuesta inmune.

10 **Antecedentes de la invención**

Un gen que codifica una proteína 29-kDa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa MC58 con homología con la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP) de *Legionella pneumophila* se clonó y expresó en *Escherichia coli*, y la proteína recombinante soluble purificada (rMIP) se usó en estudios de inmunización. El análisis de las secuencias predichas de aminoácidos de MIP de 13 cepas meningocócicas bien caracterizadas, aisladas de pacientes o portadores y diferentes en el serogrupo, serotipo, y subtipo, mostró que la proteína estaba altamente conservada (98 a 100%), y se encontraron sólo tres tipos distintos de secuencias (designadas I, II, y III). El Western Blot mostró que la proteína MIP se expresó en niveles similares por todas estas cepas. La inmunización de ratones con el tipo I MC58 rMIP en micelas de detergente y liposomas que contienen monofosforil lípido A (MPLA) indujo a altos niveles de anticuerpos de superficie reactiva con títulos de actividad bactericida del suero (SBA) 1 / 1.024 contra la cepa homóloga. Los anticuerpos bactericidas también se indujeron con la proteína en solución salina sola y liposomas solo (títulos, 1/128), pero no después de la adsorción de Al (OH)₃. De manera significativa, los antisueros activos contra rMIP tipo I administrados en solución salina o liposomas mataron cepas de tipos de secuencias heterólogas II y III con títulos similares de la SBA (1/128 a 1/256) (Hung MC, Salim S, Williams JN, Heckels JE, Christodoulides M. The *Neisseria meningitidis* macrophage infectivity potentiator protein induces cross-strain serum bactericidal activity and is a potential serogroup B vaccine candidate. (Infect Immun 2011; 79 (9):3784-91).

Además, los autores de la presente invención (datos no publicados) realizaron una serie de experimentos de inmunización utilizando rMIP en liposomas L- α -fosfatidilcolina / colesterol: (6:2 relación molar), resultando en datos similares a los mostrados anteriormente, sin embargo, también se detectó actividad bactericida con proteoliposomas tras la adsorción a Al(OH)₃ (título, 1/512). En estos experimentos la eficiencia de asociación de la rMIP a los

liposomas fue del 65%.

Además, resultados de un tercer estudio (Tsolakos N, Brookes C, Taylor S, Gorrige A, Tang CM, Feavers IM, Wheeler JX. Identification of vaccine antigens using integrated proteomic analyses of surface immunogens from serogroup B *Neisseria meningitidis*. J Proteomics. 2014;101:63-76.) mostraron que el suero específico anti-MIP reconoció al meningococo en ensayos ELISA con células enteras y permitió la opsonofagocitosis y deposición de factores del complemento en la superficie de los aislados del meningococo de diferentes serosubtipos lo que difiere de los dos estudios comentados anteriormente. Este suero específico anti-Mip no produjo la muerte de la bacteria a diluciones $\geq 1/8$. Las diferencias en las formulaciones empleadas entre los tres estudios arriba mencionados pueden explicar los diferentes resultados SBA. De hecho, en el tercer estudio comentado MIP se administró con MPLA (adyuvante) en salino. Así es posible que el uso de MPLA pudo haber afectado la conformación nativa de MIP y por tanto haber influido negativamente en el resultados mostrados.

En cualquier caso, tomados en su conjunto, estos datos sugieren que rMIP puede conferir una protección cruzada frente a meningococo y debería de ser considerado un antígeno potencial para inclusión en nuevas vacunas contra infección por meningococo.

Sin embargo, desafortunadamente la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP) presenta una baja estabilidad bajo condiciones normales de almacenamiento (se degrada fácilmente en condiciones normales de almacenamiento debido a la baja termoestabilidad del antígeno aislado). Además, no es posible liofilizar el antígeno (MIP) con el fin de incrementar su estabilidad ya que la estructura del antígeno se desestabiliza durante el proceso de liofilización. En consecuencia, estas características impiden en gran medida la aplicación de este antígeno potencial para su inclusión en nuevas vacunas contra la infección meningocócica.

Además, de la evaluación de la asociación del vehículo-antígeno en estas composiciones de vacunas en las cuales MIP se administra usando liposomas como vehículo, se concluye que el antígeno se asocia al azar al vehículo en diferentes concentraciones.

Este hecho tiene un impacto directo en la eficacia terapéutica de dichas composiciones vacunales y también sobre la naturaleza tóxica de dichas composiciones. En particular, es difícil estandarizar tales composiciones. Además, esas composiciones vacunales en las que

se utiliza un vehículo de liposoma por lo general no son composiciones vacunales protectoras libres de adyuvante. En este sentido, el desarrollo de tales composiciones vacunales protectoras libres de adyuvante reduciría en gran medida los costes de fabricación y proporcionaría composiciones farmacéuticas más seguras.

5

En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar composiciones de vacunas MIP libres de adyuvante contra la infección por meningococo, las cuales al mismo tiempo sean fáciles de estandarizar y solucionen los problemas de estabilidad antes mencionados.

10 **Breve descripción de la invención**

Los autores de la presente invención han encontrado que sorprendentemente las nanopartículas que comprenden principalmente ésteres de sorbitán son vehículos adecuados para ingredientes activos tales como una proteína como una porina (por ejemplo, la proteína rPorB) o la proteína MIP. De hecho, estas composiciones vacunales admiten una amplia gama de concentraciones de antígeno en el que la asociación y la integridad del antígeno permanecen después del almacenamiento a largo plazo en diferentes condiciones (en suspensión a 4°C, liofilizado a 4°C y liofilizado a temperatura ambiente). Además, estas composiciones son composiciones libres de adyuvantes.

20

Las nanopartículas de las composiciones vacunales de la presente invención se han descrito en WO2013068625 la cual está completamente incorporada por referencia.

Así, el primer aspecto de la invención se refiere a una composición inmunogénica, preferiblemente una composición libre de adyuvante, que comprende una nanopartícula que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100% asociada a un ingrediente activo tal como una proteína como una porina (por ejemplo la proteína rPorB) o la proteína MIP. Preferiblemente, la nanopartícula está asociada a una secuencia de aminoácido que comprende la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP) o a una parte inmunogénica de la misma o de un análogo de la misma, donde dicha secuencia aminoacídica es capaz de provocar una respuesta inmune protectora cuando se administra a un ser humano.

En un aspecto preferido del primer aspecto de la invención, la composición es capaz de provocar una respuesta inmune contra una ó más cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, cepas de *N. meningitidis* serogrupo A, cepas de *N. meningitidis* serogrupo X, cepas de *N.*

5 *meningitidis* serogrupo C, cepas de *N. meningitidis* serogrupo W135, cepas de *N. meningitidis* serogrupo Y y cepas de *N. gonorrhoeae*. En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención o de cualquiera de los aspectos preferidos del mismo, la respuesta inmune protectora producida afecta a la capacidad de *N. meningitidis* para infectar un animal inmunizado.

En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención o de cualquiera de los aspectos preferidos del mismo, la proteína MIP es una proteína recombinante.

10 En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención o de cualquiera de los aspectos preferidos del mismo, la proteína MIP tiene una secuencia con al menos el 50% de identidad con la secuencia SEQ ID No: 1, preferiblemente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de SEQ ID No:1. En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención, la proteína MIP consiste en la secuencia SEQ ID No: 1.

15 En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención o de cualquiera de los aspectos preferidos del mismo, la composición además comprende uno o más antígenos además de la proteína MIP o una parte inmunogénica de la misma o un análogo de la misma.

20 En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención o de cualquiera de los aspectos preferidos del mismo, las nanopartículas están caracterizadas por ser una matriz sólida homogénea, cuyo tamaño medio está comprendido entre 50 y 600 nm.

25 En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención o de cualquiera de los aspectos preferidos del mismo, el éster de sorbitán se selecciona de entre el grupo consistente en mono-, di-, tri- o sesqui-oleato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-laurato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-palmitato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-estearato de sorbitán; y mono-, di-, tri- o sesqui-isoestearato de sorbitán, y sus combinaciones.

30 En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención o de cualquiera de los aspectos preferidos del mismo, la composición además comprende un sustancia catiónica, donde la sustancia catiónica se selecciona preferiblemente de entre sales de amonio, polímeros catiónicos y aminas grasas o lipofílicas. Más preferiblemente, la sustancia catiónica se selecciona de protamina, ácido poliglutámico, dextrano cationizado, poliaminoácidos y
35 proteínas cationizadas, y sus sales. Aún más preferiblemente, la sustancia catiónica es oleilamina.

En otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención o de cualquiera de los aspectos preferidos del mismo, la composición está en forma liofilizada.

- 5 Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus aspectos preferidos, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 10 Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición vacunal que comprende la composición del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus aspectos preferidos.

En un aspecto preferido del tercer aspecto de la invención, la composición vacunal es útil en un método de tratamiento o prevención de infección por *N. meningitidis* y/o *Neisseria gonorrhoeae*.

15

En otro aspecto preferido del tercer aspecto de la invención, la composición vacunal es útil en un método de tratamiento o prevención de infección por *N. meningitidis* serogrupo B y/o serogrupo A y/o serogrupo X y/o serogrupo W135 y/o serogrupo Y.

- 20 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método de protección de un ser humano de los efectos de infección por *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae* que comprende administrar a un humano o un animal no humano una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

- 25 Un quinto aspecto de la invención se refiere a un kit para uso en inducir una respuesta inmune en un organismo, que comprende una composición inmunogénica o vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y opcionalmente instrucciones relativas a la administración.

30 **Descripción de las figuras**

- Figura 1:** Confirmación de la integridad del antígeno y su asociación a las nanopartículas durante el almacenamiento. La integridad estructural de rMip asociado a las nanopartículas SP-OA se analizó después de su almacenamiento (en suspensión o en forma liofilizada) a
35 temperatura ambiente (TA) y 4°C por SDS-PAGE comparándolo con nanopartículas frescas

SP-OA asociando el antígeno; no mostraron ninguna modificación en las bandas correspondientes.

Figura 2: Análisis morfológico del sistema. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas SP-OA asociando la proteína MIP después del almacenamiento durante tres, seis y nueve meses como suspensión de nanopartículas o como un producto liofilizado bajo diversas condiciones de almacenamiento: temperatura ambiente (TA) y 4°C. El examen morfológico realizado con TEM reveló la esfericidad de las nanopartículas en todas las muestras.

10

Figura 3: Protocolo de inmunización. Se inmunizaron ratones hembra ICR (Swiss) de seis semanas de edad siguiendo un esquema de tres inmunizaciones. Los sueros obtenidos se indican en la parte derecha de la figura y las formulaciones empleadas para las inmunizaciones en la parte izquierda. La parte inferior corresponde al esquema de inmunización para la obtención del suero anti-NPMipAI empleando partículas SP-OA-rMip liofilizadas y almacenadas durante 9 meses a 4 °C.

15

Figura 4: Confirmación de la capacidad del antígeno de producir anticuerpos tras su asociación a las nanopartículas. La reactividad de los sueros anti-NPMipAI, anti-NPMip y anti-Mip se comprobó empleando electroforesis SDS-PAGE en gel de agarosa al 12% y Western Blotting. Cada carril fue cargado con 18 µg de vesículas de membrana externa de la cepa H44/76 obtenidas en condiciones de restricción de hierro y la dilución de trabajo de los sueros fue 1:10000. El suero anti-NP obtenido tras la inmunización con nanopartículas SP-OA blancas (sin rMip asociada) se empleó como control negativo, resultando en ausencia de reacción.

20

25

Figura 5: Deposición de C3b/iC3b mediada por anticuerpos sobre el meningococo. Para este estudio, la unión del factor C3c del complemento se detectó por citometría de flujo empleando anticuerpos de oveja anti C3c humano marcados con FITC. Los valores FI-C' corresponden a la fluorescencia leída corregida por la fluorescencia de FITC del control sin suero. La deposición de C3b/iC3b en la superficie de la cepa homóloga y las cepas heterólogas evidencian que los sueros anti nanopartículas asociando la MIP facilitan la deposición del factor del complemento C3c en la superficie del meningococo de las cepas empleadas, de modo que se produce una respuesta de reactividad cruzada. Es destacable la elevada respuesta en el ensayo de deposición de C3b/iC3b (frente a la cepa homóloga y las cepas heterólogas) producida por el suero anti-NP-MIP no solo en comparación a la

30

35

producida por el antígeno libre, sino también con respecto a la formulación que contienen el adyuvante convencional $\text{Al}(\text{OH})_3$ (alum) al inmunizar, lo que confirma que las nanopartículas actúan en sí mismas como adyuvante resultando en una respuesta mayor que la obtenida con el adyuvante convencional alum.

5

Figura 6: Deposición de C5b-9 (MAC) mediada por anticuerpos sobre el meningococo. Para este estudio, la unión del componente C5b-9 del complemento se detectó por citometría de flujo empleando anticuerpos de oveja anti C5b-9 humano marcados con FITC. Los valores FI-C' corresponden a la fluorescencia leída corregida por la fluorescencia de FITC del control sin suero. La deposición de C5b-9 en la superficie de la cepa homóloga y las cepas heterólogas evidencian que los sueros anti nanopartículas asociando la MIP facilitan la deposición del factor del complemento C5b-9 en la superficie del meningococo de las cepas empleadas, de modo que se produce una respuesta de reactividad cruzada. Es destacable la elevada respuesta en el ensayo de deposición de MAC (frente a la cepa homóloga y las capas heterólogas) producida por el suero anti-NP-MIP no solo en comparación a la producida por el antígeno libre, sino también con respecto a la formulación que contienen el adyuvante convencional $\text{Al}(\text{OH})_3$ (alum) al inmunizar, lo que confirma que las nanopartículas actúan en sí mismas como adyuvante resultando en una respuesta mayor que la obtenida con el adyuvante convencional alum.

10
15
20

Figura 7: Ensayo de opsonofagocitosis. La opsonofagocitosis se realizó empleando células del meningococo teñidas con fluorescencia y células HL60 diferenciadas a granulocitos. Células meningococales de cada una de las cepas teñidas con BCECF fueron incubadas con complemento humano y con los sueros inmunes frente a la MIP seguido de incubación con las células fagocíticas HL60. La internalización de las bacterias teñidas por las células LH60 se determinó midiendo la fluorescencia BCECF (equivalente a fluoresceína) por citometría de flujo. Los valores FI-C' corresponden a la fluorescencia leída corregida por la fluorescencia de BCECF del control sin suero. Aunque la respuesta opsonofagocítica parece variable los resultados evidencian que los sueros anti nanopartículas asociadas a la MIP facilitan la opsonofagocitosis en la superficie del meningococo de las cepas empleadas, de modo que se produce una respuesta de reactividad cruzada. La respuesta opsonofagocítica del suero anti-NP-MIP fue similar a la producida por el suero anti-MIP siendo incluso mayor frente a la cepa homóloga H44/76 y las cepas heterólogas 3063 y NmP27. Además, frente a la cepa H44/76 y la cepa heteróloga NZ98/254 la respuesta fue superior que la producida por la formulación que incluía el adyuvante convencional $\text{Al}(\text{OH})_3$ (alum) en la inmunización.

25
30
35

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones novedosas, y en particular, a composiciones inmunogénicas novedosas, que comprenden un ingrediente activo tal como una proteína como una porina (por ejemplo la proteína rPorB) o la proteína MIP, y al uso de estas composiciones para provocar una respuesta inmune. En particular, los autores de la presente invención han encontrado que sorprendentemente las nanopartículas que comprenden principalmente ésteres de sorbitán son vehículos particularmente adecuados para composiciones vacunales que comprenden la proteína MIP para uso en la prevención de infección de *N. meningitidis*. Sin embargo, se apreciará que estas composiciones se pueden utilizar en la prevención de la infección por otros patógenos relacionados, o patógenos con una proteína MIP similar. Dichos patógenos incluyen *Neisseria gonorrhoeae*.

Con el fin de demostrar que las nanopartículas que principalmente comprenden ésteres de sorbitán son particularmente adecuadas como vehículos para composiciones vacunales que comprenden la proteína MIP, los autores de la presente invención han evaluado primero la asociación nanopartículas-antígeno (ver ejemplo 2). Para este propósito han testado un amplio rango de concentraciones del antígeno por mL de nanopartículas en suspensión, a saber de 100µg a 3 mg. Como resultado de este experimento, los autores concluyeron que a todas las concentraciones utilizadas, el 100% de las proteínas se asociaron siempre a las nanopartículas (medida indirecta después de la centrifugación de la suspensión nanopartículas-antígeno mostró que no había proteínas en el sobrenadante a todas las concentraciones empleadas) Este resultado claramente muestra que las composiciones de la presente invención pueden ser fácilmente estandarizadas.

Además, los autores de la presente invención han determinado la estabilidad de los sistemas nanopartículas-antígeno (ver ejemplo 3). A este respecto, los autores de la presente invención han evaluado la estabilidad del sistema durante el almacenamiento en las siguientes condiciones:

30

Condiciones de almacenamiento

- Liofilizado y almacenado a 4°C (Iyo 4°C)
- Liofilizado y almacenado a temperatura ambiente
- Suspensión acuosa del sistema a 4°C

35

Después de tres meses, la presencia del antígeno después de la re-suspensión de las

muestras liofilizadas y las muestras en suspensión acuosa fue del 100% del antígeno asociado. Después de nueve meses, la presencia de antígeno después de la re-suspensión de las muestras liofilizadas y las muestras en suspensión acuosa era del 97% del antígeno asociado; este fue el caso incluso a temperatura ambiente.

5

Además y como se muestra en el ejemplo 4, los autores de la presente invención han analizado las propiedades de la composición o sistema de la invención (tamaño, morfología esférica, polidispersión y carga superficial (potencial Z)) después de un tiempo prolongado de almacenamiento y determinaron que éstas se mantenían. Además, los autores han confirmado que el antígeno permanece asociado al sistema después de 9 meses de almacenamiento y que a integridad del antígeno se mantiene después de dicho periodo.

10

Así, estos resultados claramente ilustran que las composiciones de la presente invención son estables.

15

Por último, los autores de la presente invención han determinado las propiedades inmunológicas del sistema nanopartículas-antígeno (composición de la invención) (ver ejemplo 5). En primer lugar, como se muestra en la Figura 4 el antígeno mantiene la capacidad para producir anticuerpos después de su asociación a las nanopartículas. En segundo lugar, la respuesta inmunológica alcanzada en el ratón por el antígeno MIP asociado a las nanopartículas aumentó respecto al alcanzado mediante la inmunización con el antígeno aislado. En tercer lugar, la inmunización con el lote almacenado a largo plazo (9 meses) del sistema de nanopartículas-antígeno alcanzó la misma respuesta inmunológica que un lote fresco. Por último, el sistema produjo protección contra diversas cepas bacterianas serogrupo B diferentes de la homóloga. Es de destacar que el sistema produce una mayor protección sin la presencia de un adyuvante que con la presencia de un adyuvante (tal como aluminio AL) como se ilustra mediante la comparación de las nanopartículas anti-NP-MIP con las nanopartículas anti-NP-MIP-AL mostrada en las figuras 5 a 7.

20

25

30

Así, el primer aspecto de la invención se refiere a una composición inmunogénica, preferiblemente una composición libre de adyuvante, que comprende una nanopartícula que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100% asociada a un ingrediente activo tal como por ejemplo como una proteína como una porina (por ejemplo la proteína rPorB) o la proteína MIP o una parte inmunogénica de la misma o un análogo de la misma, donde dicho ingrediente activo es capaz de provocar una respuesta

35

5 inmune, preferiblemente una respuesta protectora, cuando se administra a un sujeto mamífero, preferiblemente un ser humano. En una realización particular, las nanopartículas comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 80% y 100%. Más preferiblemente las nanopartículas de la invención comprenden un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 90% y 100%. En una realización particular, las nanopartículas de la invención están además caracterizadas por no comprender aceites o componentes oleosos.

10 Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una composición inmunogénica, preferiblemente una composición libre de adyuvante, que comprende una nanopartícula que comprende un éster de sorbitán a una proporción en peso de entre 60% y 100% asociada a una secuencia de aminoácido que comprende la proteína MIP o una parte inmunogénica de la misma o un análogo de la misma, donde dicha secuencia de aminoácido es capaz de provocar una respuesta inmune, preferiblemente protectora, cuando se
15 administra a un sujeto mamífero, preferiblemente a un ser humano. En una realización particular, las nanopartículas comprenden un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 80% y 100%. Más preferiblemente, las nanopartículas de la invención comprenden un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 90% y 100%. En una realización particular, las nanopartículas de la invención están además caracterizadas por no
20 comprender aceites o componentes oleosos.

La proteína MIP está presente en la membrana externa de *N. meningitidis*. La proteína MIP está codificada por el gen MIP la secuencia a la cual se puede acceder en la página web de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando el número de acceso NMB1567. Con
25 referencia a la cepa *Neisseria* MC58 la proteína MIP es una proteína de 272 aminoácidos mostrados en SEQ ID NO 1.

SEQ ID NO 1:

30 mntifkisalstlsaalalsacgkkeaapasasepaaassaagdtssigstmqqasyamgvdigrslkqmkeggae
idlkvfteamqavydgkeikmteeqaevmnkflqeqqakavekhkadankankegeaflkenaakdgvkttasg
lqykitkqgegkqptkddivtveyegrldgtvfdsskanggpvtfplsqvipgwtvegqllkeggeatfyipn
layreqgagdkigpnatlvfdvklvkigapenapakqpaqvdkkvn

35 Como se emplea en la presente invención la proteína MIP puede ser una proteína de cualquier secuencia de SEQ ID NO 1, o una proteína con un 50%, 60% 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, preferiblemente 80% o más, preferiblemente 85% o más, preferiblemente 90% o más, preferiblemente 95% o más, de identidad de secuencia

con la proteína MIP de SEQ ID NO 1.

5 Como se usa aquí, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de una secuencia de polipéptido incluye la referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada. Cuando se utiliza el porcentaje de identidad de secuencia en relación a proteínas se reconoce que las posiciones de residuos que no son idénticas a menudo difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos, donde se sustituyen residuos de aminoácidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo carga o hidrofobicidad) y así no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Las secuencias que difieren en tales sustituciones conservadoras se dice que tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, implica puntuar una sustitución conservadora como un parcial en lugar de una falta de coincidencia completa, aumentando así el porcentaje de identidad de secuencia. Así, por ejemplo, donde se da a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y a una sustitución no conservadora se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservadora se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, por ejemplo con el algoritmo de Meyers y Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4:11-17 (1988) por ejemplo, como se implementó en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, USA).

25 Como se usa aquí, "porcentaje de identidad de secuencia", significa el valor determinado mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alienadas sobre una ventana de comparación, donde la proporción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo espacios) cuando se comparan con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o deleciones) para un óptimo alineamiento de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico o residuo de aminoácido son idénticas en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

35 Como se usa aquí, un "análogo" de la proteína MIP puede incluir una variante en la cual uno

o más residuos son añadidos, eliminados, insertados o sustituidos, mientras no tiene un efecto material sobre la función de la proteína. Es decir, un análogo según un aspecto de la presente invención debería de ser capaz de inducir un anticuerpo o una respuesta T-celular a la proteína MIP de *N. meningitidis*. Un residuo (o residuos) puede ser añadido o eliminado desde cualquier extremo de la proteína, eliminado de dentro de la proteína, insertado dentro de la proteína, o sustituido por uno o más de los residuos dentro de la proteína. Como se entenderá por un experto en la materia, uno o más residuos de la proteína pueden ser añadidos, eliminados, insertados o sustituidos mientras que todavía mantiene la función de la proteína. Por ejemplo, tantos como cinco o más residuos pueden ser añadidos o eliminados de cualquiera de los extremos de la proteína, o insertados en la proteína, y se considera una proteína análoga en el contexto de la presente invención. En un ejemplo adicional, una sustitución conservadora de uno o más residuos dentro de una proteína puede resultar en una proteína análoga. Como es bien conocido por el experto en la materia, una sustitución conservadora incluye una sustitución de un residuo de aminoácido con otro residuo de aminoácido que tiene una o más propiedades químicas similares, tales como polaridad, carga, hidrofobicidad o aromaticidad, por ejemplo.

La proteína MIP, o una parte inmunogénica de la misma, o un análogo de la misma, puede además comprender secuencias adicionales, por ejemplo, para uso en la purificación de la proteína. Por ejemplo, si la proteína es una proteína recombinante la proteína puede incluir una secuencia his-tag para uso en la purificación de la proteína.

Como se emplea en la presente solicitud, una “parte inmunogénica” puede incluir cualquier parte de la proteína MIP que puede ser usada para provocar una respuesta inmune protectora cuando se administra a un ser humano. La composición puede también comprender un análogo o una parte inmunogénica de la proteína MIP.

En la presente invención, por el término “nanopartícula(s)” se entiende que son materiales coloidales sólidos, cuyo “tamaño promedio” oscila entre 1 y 999 nm, que poseen una estructura bajo la forma de matriz sólida; además se caracterizan por ser estructuras estables y de características homogéneas, reproducibles y modulables perfectamente.

Por el término “tamaño promedio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas que se mueven juntas en un medio acuoso. El tamaño promedio de estos sistemas puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica.

Las nanopartículas de los sistemas de la invención son perfectamente diferenciables de otros sistemas coloidales por sus características estructurales, así por ejemplo, las nanopartículas de la invención no presentan las bicapas lipídicas características de los liposomas; y tampoco poseen un núcleo oleoso característicos de nanoemulsiones o nanocápsulas. Las nanopartículas de la invención no comprenden aceites ni componentes oleosos.

Por “mamífero” o “sujeto mamífero” se entiende cualquier miembro de la clase *Mammalia* incluyendo, sin limitación, humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no denota una edad o sexo particular. Por lo tanto, pretende incluir sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean hombres o mujeres.

Las nanopartículas de la composición de la invención tienen un tamaño de partícula promedio de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 50 y 600 nm, incluso más preferiblemente de entre 100 y 400 nm. El tamaño promedio de las partículas está influido principalmente por la composición y las condiciones de formación de partículas establecidas en el procedimiento de obtención seleccionado.

La población de las nanopartículas de la invención que se mueven juntas en un medio acuoso presenta un índice de polidispersión inferior a 0,2, más preferiblemente de entre 0 y 0,1. Esto quiere decir que las partículas comprendidas en el sistema poseen una distribución de tamaños homogénea.

Las nanopartículas de los sistemas de la invención poseen una estructura matricial que permite incorporar componentes adicionales que aumentan y mejoran su estabilidad, como por ejemplo polímeros aniónicos y/o catiónicos y modificaciones con óxido de etileno. En una realización particular de la invención, las nanopartículas comprenden adicionalmente una sustancia catiónica, aniónica, un derivado de óxido de etileno, o combinaciones de los mismos, en una proporción en peso entre el 0% y 40% respecto al peso total de los componentes de la nanopartícula. En una realización particular, la proporción en peso de la sustancia catiónica, la sustancia aniónica, el derivado de óxido de etileno o la combinación

de los mismos, está comprendida entre 0% y 20% respecto al peso total de los componentes de la nanopartícula; más particularmente entre 0% y 10%.

5 En una realización particular, las composiciones de la invención comprenden además una sustancia catiónica.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “sustancia catiónica” aquella molécula dotada de carga eléctrica positiva, por ejemplo sales de amonio, polímeros catiónicos y aminas grasas o lipofílicas.

10

En una realización particular, la sustancia catiónica se selecciona entre protamina, ácido poliglutámico, dextrano cationizado, poliaminoácidos y proteínas cationizadas, y sus sales.

15

El término “cationizado” hace referencia a la presencia de un grupo con carga positiva, que puede estar presente de forma natural o puede ser introducido mediante una reacción química.

20

En una realización particular, los poliaminoácidos se seleccionan de entre polilisina y poliarginina. En otra realización particular, las proteínas cationizadas se seleccionan de entre gelatina, albúmina, colágeno y atelocolágeno, y sus derivados cationizados.

25

En una realización particular, las sales de amonio se seleccionan entre bromuro de cetil trimetil amonio y cloruro de benzalconio. En otra realización particular, la amina grasa es oleilamina (*cis*-1-amino-9-octadecene).

30

En una realización particular, los sistemas de la invención pueden comprender además una sustancia aniónica. De forma preferida, la sustancia aniónica es un polímero aniónico.

Por el término “polímero aniónico” se entiende cualquier polímero con una carga neta negativa, incluyendo en dicha definición aquellos polímeros aniónicos sobre los que se han efectuado modificaciones tales como fragmentación enzimática o química o derivatización.

35

El polímero aniónico se selecciona de entre el grupo constituido por ácido hialurónico, ácido colomínico, polisialico, condroitina, queratano, dextranos, heparina, carragenanos, furceleranos, alginatos, agar agar, glucomanano, goma gelano, goma garrofín, goma guar,

goma tragacanto, goma arábica, goma xantano, goma karaya, pectinas, celulosas, almidones, sus sales, fragmentos, derivados o combinaciones de los mismos.

Las nanopartículas pueden comprender opcionalmente un derivado de óxido de etileno.

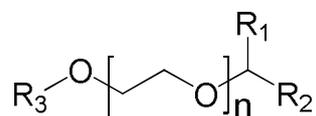
5

Para los fines de la presente invención, se entiende por “derivado de óxido de etileno” un compuesto en el que se repite una unidad $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$.

En una realización particular, el derivado de óxido de etileno es un compuesto de fórmula I:

10

Fórmula I



donde R1 es un grupo carbonilo o hidrógeno; R2 es un grupo alquilo, alquenilo o alquínilo, de entre 2 a 24 átomos de carbono; R3 es hidrógeno o un grupo alquilo de entre 1 a 6 átomos de carbono; n es un valor de entre 1 y 100. En una realización particular, n tiene un valor de entre 1 y 50, más preferiblemente entre 1 y 24.

Ejemplos de derivados de óxido de etileno, sin limitarse a éstos, son polietilenglicol dodecil éter (Brij 30), polietilenglicol hexadecil éter (Brij 56), polietilenglicol 2-octadecil éter (Brij 72), polietilenglicol 8-octadecil éter (Brij 78), polietilenglicol 8-estearato (Myrj 45), 2-hidroxietyl octadecanoato (Myrj 52), monoestearato de etilen glicol, monoestearato de trietilen glicol.

En otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden, adicionalmente, al menos un marcador. En la presente invención se entiende como “marcador” aquel elemento, compuesto, célula o conjunto de células que permita realizar un estudio de localización del mismo, obtener una imagen, señal o información del lugar o los lugares en los que se distribuye, determinar un parámetro bioquímico, inmunológico o metabólico o bien realizar un diagnóstico. Son ejemplos de marcadores una molécula fluorescente, como por ejemplo fluoresceína o Texas Network; quantum dots; un isótopo radiactivo; un agente de contraste, por ejemplo radiológico, de resonancia o de tomografía; un antígeno de membrana; un agente de tinción, etc.

30

Por otra parte, las nanopartículas presentan carga eléctrica (medida mediante el potencial Z), cuya magnitud puede ser modulada mediante una adecuada selección de la composición del sistema. Concretamente, dicha carga eléctrica puede tomar valores positivos o negativos dependiendo de los componentes del sistema y la proporción existente entre los mismos. El potencial zeta de las nanopartículas de los sistemas de la invención puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica.

En una realización particular de la invención, las nanopartículas presentan carga que varía entre -50 mV y $+60$ mV, incluso más preferiblemente entre -40 mV y $+50$ mV, dependiendo de la proporción de los componentes.

Por otro lado, la posibilidad que ofrece la presente invención de modular la carga eléctrica de las nanopartículas presenta grandes ventajas. Así, una carga negativa es particularmente adecuada para garantizar la estabilidad de las nanopartículas tras la administración por vía parenteral. En una realización particular, la invención se refiere a las nanopartículas anteriormente descritas caracterizadas por presentar una carga comprendida entre -50 mV y -20 mV.

Además, la carga positiva resulta especialmente adecuada para mejorar la interacción con las mucosas (que generalmente presentan una carga negativa). Es posible modular la carga de las nanopartículas de la invención para que presenten carga positiva, por ejemplo y sin limitarse a estos casos, cuando comprenden además una sustancia catiónica en una proporción que no supera el 40% en peso en relación al peso total de los componentes del sistema. Y así, en una realización particular, la invención se refiere a las nanopartículas anteriormente descritas caracterizadas por presentar una carga comprendida entre $+55$ mV y $+20$ mV.

El sorbitán está constituido por una mezcla de anhídridos cíclicos del sorbitol, como por ejemplo y sin que se limite a estos, el 1,4-anhidrosorbitol, 1,5-anhidrosorbitol y 1,4,3,6-dianhidrosorbitol.

Se entiende por “ésteres de sorbitán” los derivados esterificados del sorbitán donde los grupos éster poseen un sustituyente seleccionado de entre alquilo, alquenilo y alquinilo. Los ésteres de sorbitán incluyen derivados en los que uno, dos, tres o cuatro grupos hidroxilo están esterificados, e incluso incluyen derivados esterificados en los que una molécula de éster está presente por cada dos moléculas de sorbitán (en cuyo caso se nombran con el

prefijo “sesqui-“). Así, por ejemplo, el monooleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultado de la esterificación de un grupo hidroxilo con el ácido oleico; el trioleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultante de la esterificación de tres grupos hidroxilo del sorbitán con el ácido oleico.

5

Se entiende por “alquilo” una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que no contiene ninguna instauración, de 1 a 24 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-OR^b$, $-SR^b$, $-NR^aR^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^aR^b$, $-NR^aC(O)R^b$, $-NR^aC(O)OR^b$, $-NR^aC(O)NR^aR^b$, $-CF_3$, $-OCF_3$; donde R^a y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, alquenilo y alquinilo.

10

“Alquenilo” y “alquinilo” en los compuestos de la presente invención se refieren a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene al menos una instauración, de 2 a 24 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-OR^b$, $-SR^b$, $-NR^aR^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^aR^b$, $-NR^aC(O)R^b$, $-NR^aC(O)OR^b$, $-NR^aC(O)NR^aR^b$, $-CF_3$, $-OCF_3$; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

15

En una realización preferida el alquilo, alquenilo y alquinilo poseen una cadena de entre 6 y 24 átomos de carbono, más preferiblemente de entre 10 y 16 átomos de carbono.

20

En una realización particular, el éster de sorbitán se selecciona de entre el grupo consistente en mono-, di-, tri- o sesqui-oleato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-laurato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-palmitato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-estearato de sorbitán y mono-, di-, tri- o sesqui-isoestearato de sorbitán, y sus combinaciones.

25

Los ésteres de sorbitán son tensioactivos no iónicos debido a que contienen dos regiones localizadas, una de naturaleza hidrófila y otra hidrófoba. Estos tensioactivos no iónicos tienen la ventaja de ser menos irritantes que los tensioactivos aniónicos o catiónicos. Además son generalmente compatibles con sustancias tanto aniónicas como catiónicas, puesto que no se ionizan en solución.

30

Preferiblemente la respuesta inmune producida por la composición de la invención afecta la capacidad de *N. meningitidis* y/o *N. Gonorrhoeae* para infectar a un ser humano. Preferiblemente la capacidad de *N. meningitidis* y/o *N. Gonorrhoeae* para infectar a un humano inmunizado con la composición de la invención es impedida o prevenida. Esto

35

puede ser conseguido de varias formas. La respuesta inmune producida puede reconocer y destruir *N. meningitidis* y/o *N. Gonorrhoeae*. Alternativamente, o adicionalmente, la respuesta inmune producida puede impedir o prevenir la replicación de *N. meningitidis* y/o *N. Gonorrhoeae*. Alternativamente, o adicionalmente, la respuesta inmune producida puede impedir o prevenir *N. meningitidis* y/o *N. Gonorrhoeae* causando la enfermedad en el humano o animal no humano.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición es capaz de provocar una respuesta inmune contra una o más cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, cepas de *N. meningitidis* serogrupo A, cepas de *N. meningitidis* serogrupo X, cepas de *N. meningitidis* serogrupo C, cepas de *N. meningitidis* serogrupo W135, cepas de *N. meningitidis* serogrupo Y y/o *N. Gonorrhoeae*. En otra realización preferida, la respuesta inmune protectora producida afecta la capacidad de cepas de *N. meningitidis* serogrupo B para infectar a un animal inmunizado.

La proteína MIP puede ser recuperada de *N. meningitidis* y/o puede ser producido recombinantemente y/o puede ser un producto sintético, por ejemplo producido mediante una síntesis peptídica o traslación in vitro. La composición de la invención puede también comprender además uno o más antígenos, además de la proteína MIP o una parte inmunogénica de la misma, o un análogo de la misma. Estos antígenos adicionales puede ser seleccionados de entre la siguiente lista: NadA, NHBA, fHBP PorA, PorB, PilQ, PilE, proteína de complejo de adhesión (ACP), NspA, DsbA, DsbC, FbpA, TbpA, TbpB, 60-kDa chaperonin, H.8 proteína membrana externa/Lip, RmpM, Capsular polysaccharide, LPS and derivados, Hbp y proteínas de opacidad Opa and Opc. Los antígenos adicionales pueden también ser derivados de *N. meningitidis*, y puede ser capaz de provocar una respuesta inmune dirigida a *N. meningitidis*.

La composición se puede usar para provocar/producir una respuesta inmune protectora cuando se administra a un sujeto. La respuesta inmune protectora puede causar *N. meningitidis* que deben ser matada sobre infección del sujeto, o puede prevenir o inhibir que la *N. meningitidis* se replique y / o que cause enfermedad. La composición puede usarse como un profiláctico o una vacuna terapéutica dirigida a *N. meningitidis*, y en particular *N. meningitidis* serogrupo B. La composición también o alternativamente puede ser utilizada como un profiláctico o una vacuna terapéutica dirigida a *N. gonorrhoeae*.

Según un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que

comprende la proteína MIP o una parte inmunogénica de la misma o un análogo de la misma y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente la composición farmacéutica comprende una composición según el primer aspecto de la invención. Preferiblemente la composición farmacéutica es capaz de producir una respuesta inmune protectora para *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae*.

La frase "producir una respuesta inmune protectora" como se usa aquí significa que la composición es capaz de generar una respuesta protectora en un organismo huésped, tal como un ser humano, a quien se le administra. Preferiblemente una respuesta inmune protectora protege contra la subsecuente infección por *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae*. La respuesta inmune protectora puede eliminar o reducir el nivel de la infección mediante la reducción de la replicación de *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae*, o por afectar el modo de acción de *N. meningitidis* y/o *N. Gonorrhoeae*, para reducir la enfermedad. Preferiblemente la respuesta protectora se dirige al menos a *N. meningitidis* serogrupo B.

Excipientes aceptables y vehículos adecuados para las composiciones farmacéuticas de la invención serán bien conocidos por los expertos en la técnica.

La composición de la presente invención puede ser empleada como vacunal contra infecciones causadas por *N. meningitidis*, en particular serogrupo B, y posiblemente también serogrupo A y/o serogrupo C y/o serogrupo W135 y/o serogrupo X y/o serogrupo Y y/o *N. Gonorrhoeae*. La composición puede ser usada como vacuna dirigida a *N. meningitidis* u otras enfermedades meningocococicas invasivas incluyendo septicemia o shock séptico, y/o como vacuna dirigida a *N. Gonorrhoeae*. La vacuna puede ser administrada profilácticamente a aquellos en riesgos de exposición a *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae* y/o terapéuticamente a personas que ya han estado expuestas a *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae*.

Preferiblemente, si la composición se utiliza como una vacuna, la composición comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno donde la composición comprende la proteína MIP o una parte inmunogénica de la misma, o un análogo de la misma. Una "cantidad inmunológicamente eficaz" de un antígeno es una cantidad que cuando se administra a un individuo, bien en una sola dosis o en una serie de dosis, es eficaz para el tratamiento o prevención de la infección por *N. meningitidis* y / o *N. gonorrhoeae*. Esta cantidad variará dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratar y en el antígeno. Determinación de una cantidad eficaz de una composición inmunogénica o vacuna para la administración a un organismo está bien dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

Una composición según la invención puede ser para administración oral, sistémica, parenteral, tópica, mucosal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intranasal, intravaginal, intrarrectal, transdérmica, sublingual, inhalación o la administración en aerosol.

La composición puede estar dispuesta para ser administrado como una dosis única o como parte de un programa de dosis múltiple. Las dosis múltiples pueden administrarse como una inmunización primaria seguida por una o más inmunizaciones de refuerzo. Tiempos adecuados entre el cebado y las inmunizaciones impulsando pueden determinarse de forma rutinaria.

Una composición según la invención puede ser utilizado en forma aislada, o puede ser combinado con uno o más otras composiciones inmunogénicas o de vacuna, y / o con uno o más de otros regímenes terapéuticos.

Las composiciones de la invención pueden ser capaces de inducir respuestas de anticuerpos bactericidas en suero y provocar anticuerpos que median la opsonofagocitosis después de ser administrado a un sujeto. Estas respuestas se miden convenientemente en ratones y los resultados son un indicador estándar de eficacia de la vacuna.

Las composiciones de la invención pueden también, o alternativamente, ser capaz de provocar una respuesta inmune que neutraliza proteínas bacterianas u otras moléculas, lo que les impide tener su función normal y prevenir o reducir la progresión de la enfermedad sin destruir necesariamente la bacteria/organismo patogénico, en este caso de *N. meningitidis* y / o *N. gonorrhoeae*.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de la composición de la invención en la preparación de un medicamento para provocar una respuesta inmune. El medicamento puede ser utilizado para la vacunación profiláctica o terapéutica de los sujetos contra *N. meningitidis* y / o *N. gonorrhoeae*. El medicamento puede ser un profiláctico o una vacuna terapéutica. La vacuna puede ser para la meningitis, septicemia y / o shock séptico causado por *N. meningitidis*.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona la composición de la invención para su uso en la generación de una respuesta inmune a *N. meningitidis* y / o *N. gonorrhoeae*. La respuesta inmune puede ser profiláctico o terapéutico. La composición

5 puede ser para su uso como una vacuna. Según aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de protección de un ser humano o animal no humano de los efectos de la infección por *N. meningitidis* y / o *N. gonorrhoeae* que comprende administrar al animal humano o no humano una composición según cualquier otro aspecto de la invención. La composición puede ser una vacuna.

10 Según otro aspecto, la invención proporciona un método para obtener una respuesta inmune en un animal humano o no humano que comprende administrar una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a la humana o animal no humano. La respuesta inmune es preferentemente protectora. El método puede plantear una respuesta de refuerzo en un paciente que ya ha sido imprimada. La respuesta inmune puede ser profiláctico o terapéutico.

15 Una forma de comprobar la eficacia de un tratamiento que comprende la administración terapéutica de una composición de acuerdo con la invención implica el monitoreo para *N. meningitidis* y / o la infección por *N. gonorrhoeae* después de la administración de la composición. Una forma de comprobar la eficacia de un tratamiento profiláctico comprende la administración de una composición de acuerdo con la invención implica respuestas inmunes de vigilancia para *N. meningitidis* y / o *N. gonorrhoeae* después de la administración de la composición.

20 Según otro aspecto, la invención proporciona el uso de la composición de la invención en la preparación de un medicamento para uso en la inmunización de mamíferos humanos o no humanos contra la infección por *N. meningitidis* y / o *N. gonorrhoeae*. De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona un kit para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un organismo, que comprende una composición inmunogénica o vacuna según la invención y las instrucciones relativas a la administración.

30 Además de su uso como vacunas, las composiciones de acuerdo con la invención pueden ser útiles como reactivos de diagnóstico y como una medida de la competencia inmunitaria de una vacuna.

Mientras que todos los estados de la invención y características preferidas descritos anteriormente se refieren a *N. meningitidis*, el hombre en la técnica apreciará que igualmente podrían aplicarse a *N. gonorrhoeae*.

35 Se apreciará que las características opcionales aplicables a un aspecto de la invención se

pueden usar en cualquier combinación, y en cualquier número. Además, también se pueden utilizar con cualquiera de los otros aspectos de la invención en cualquier combinación y en cualquier número. Esto incluye, pero no se limita a, las reivindicaciones dependientes de cualquier reclamo que se utilizan como reivindicaciones dependientes para cualquier otra reclamación en las reivindicaciones de esta solicitud.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se describirán ahora, meramente a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

10 Ejemplos

Durante la exposición de algunos de los siguientes ejemplos se hace referencia a resultados obtenidos mediante las siguientes técnicas:

15 La caracterización morfológica de las nanopartículas se llevó a cabo por microscopía electrónica de transmisión. Como paso previo a la visualización por microscopía electrónica de transmisión (CM 12 Philips, Eindhoven, Holanda), se recurrió a la tinción de las muestras utilizando una solución de ácido fosfotúngstico al 2%. Para ello, sobre una rejilla de 400 μm de luz de malla, recubierta con una película de Formvar, se añadieron 10 μL de la suspensión de nanopartículas. Trascurrido 1 minuto, se desecó por capilaridad la muestra con papel filtro, tocando suavemente el borde de la gota con un trozo del papel. La etapa siguiente consiste en la tinción propiamente dicha con 10

20 μL de ácido fosfotúngstico al 2%, que se deja actuar sobre la muestra durante 1 minuto, transcurrido el cual se procede a secar nuevamente el exceso de líquido como se acaba de comentar. A continuación se realiza un lavado de la rejilla con agua durante 30 segundos para retirar el exceso de ácido fosfotúngstico, tomando después las mismas precauciones para secarla. Por último, las muestras se mantienen en los correspondientes portamuestras dentro de un desecador hasta su observación.

30 El tamaño de las nanopartículas ha sido determinado mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (PCS) y haciendo uso, para ello, de un Zeta Sizer (Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK) obteniendo el tamaño medio de la población y el índice de polidispersión de la misma. Para ello las muestras fueron convenientemente diluidas en agua mili-Q.

35

El potencial Zeta de las nanopartículas ha sido determinado mediante la técnica de anemometría por dispersión de láser (LDA) y haciendo uso, para ello, de una Zeta Sizer (Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). Para ello las muestras fueron convenientemente diluidas en una disolución milimolar de KCl.

5

Los ésteres de sorbitán, empleados en el desarrollo de las nanopartículas, fueron adquiridos en Sigma (España).

Ejemplo 1: Preparación de las nanopartículas

10

Para la preparación de las nanopartículas de SP usadas en los ejemplos, una solución de 6.6 mg/mL de Span 80 fue preparada en 30 ml de etanol (fase orgánica), y fue posteriormente añadida bajo agitación magnética a 60 mL de fase acuosa, produciéndose la formación espontánea de las nanopartículas.

15

Es posible incorporar otros componentes, como la Oleilamina (OA), disolviéndola en la fase orgánica a una concentración de 0.33 mg/mL. A continuación se eliminó el etanol en un rotavapor bajo presión reducida, y se concentró el volumen de la suspensión de nanopartículas hasta un volumen final de 10 mL.

20

Las nanopartículas preparadas usando Span® 80 y con una superficie positiva debido a la incorporación de OA en el sistema, fueron usadas para asociar la proteína MIP. Para ello la proteína MIP, cargada negativamente, fue asociada a la superficie de las nanopartículas mediante una incubación con las nanopartículas en un ratio 1:1 (v/v) bajo agitación a temperatura ambiente. En concreto, la proteína MIP se disolvió en agua Milli-Q a una

25

concentración entre 100 µg/mL y 3 mg/mL y fue incorporada a la suspensión de las nanopartículas, todo el volumen se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación mecánica suave en un agitador de vaivén durante 1 hora.

30

Estas nanopartículas desarrolladas con composición inmunogénica, que tienen asociada la proteína MIP, podrían utilizarse directamente como una suspensión de nanopartículas o podrían ser liofilizadas, dando así como resultado un polvo con una mejor estabilidad en almacenamiento y listo para ser usado después de su reconstitución en un medio acuoso, o directamente como un polvo en algunos casos (es decir, la administración pulmonar).

35

Ejemplo 2: Evaluación de la asociación del antígeno a las nanopartículas

La asociación de la proteína MIP a las nanopartículas fue determinada indirectamente después de una filtración-centrifugación de la formulación de nanopartículas resultante (12000 rpm, 4 min, 4°C; Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices, Merck Millipore, Irlanda; Microfuge 22R, Beckmann Coulter, GmB), recuperando completamente el sobrenadante de cada muestra centrifugada y midiendo su contenido proteico por triplicado, empleando para ello un análisis de BCA. Los resultados mostraron una eficacia de asociación del 100%.

Las medidas de tamaño y potencial zeta de las nanopartículas se llevaron a cabo mediante espectroscopía de correlación fotónica y anemometría laser Doppler, respectivamente. Los autores de la presente invención midieron dichas nanopartículas, como se puede observar en el ejemplo 1, las nanopartículas de SP-OA tenían un tamaño nanométrico de 188 nm y una carga superficial positiva de +45 mV. Sin embargo, cuando fueron incubadas con el antígeno, la carga superficial positiva pasó a ser negativa y el tamaño medio de partícula se incrementó (Tabla 1). Esto es debido a la asociación de la molécula aniónica de antígeno a la superficie del sistema de nanopartículas, lo que confirma la asociación efectiva del ingrediente activo con los nanosistemas.

Tabla 1: Caracterización de las nanopartículas preparadas usando monooleato de sorbitán (Span® 80) y modulación de su carga superficial mediante la incorporación de OA (SP-OA), asociando el antígeno MIP. (Pdl: índice de polidispersión).

Composición de las NPs	MIP (mg/ml)	Tamaño (nm)	PdI	ζ Potencial (mV)
Sólo MIP		159,6 ± 11.4	0.426	-5.07 ± 1.4
SP-OA	0	188.5 ± 0.05	0.051	+45.4 ± 0.5 ⁵
SP-OA + MIP	0.1	4145	0.559	-
	0.25	963.3 ± 105.8	0.352	+12.5 ± 0.41 10
	0.5	742.4 ± 37.4	0.088	-6.8 ± 0.5
	1	323.7 ± 6.3	0.180	-16.2 ± 0.4
	1.5	282.1 ± 5.8	0.156	-24.9 ± 0.5 ₁₅
	2	283.2 ± 8.5	0.152	-29.2 ± 0.4
	3	258.2 ± 6.5	0.098	-39.7 ± 0.1

20 Tabla 1

Ejemplo 3: Evaluación de la estabilidad del sistema durante el almacenamiento y confirmación de la integridad del antígeno y su asociación a las nanopartículas durante el almacenamiento

25

Con el fin de mejorar la estabilidad de las nanopartículas desarrolladas, estos sistemas fueron liofilizados y posteriormente sometidos a un estudio de estabilidad a largo plazo. Para ello, las nanopartículas frescas de SP-OA asociando la proteína rMIP fueron diluidas con un 5% de una solución de glucosa como crioprotector (1:1 v/v) antes de ser liofilizadas.

30

El análisis de la integridad estructural de rMip asociada a las nanopartículas de SP-OA durante el almacenamiento (en suspensión o liofilizado) a temperatura ambiente (TA) o a 4 °C, se realizó primero por SDS-PAGE y se comparó con las nanopartículas frescas en suspensión y con las nanopartículas recién preparadas y posteriormente liofilizadas. Cuatro

35 μ l de cada muestra se separaron en un gel de poli(acrilamida) al 12% y se analizó la degradación de la proteína por tinción con Coomassie (Figura 1). No se detectaron

diferencias entre las muestras frescas y las almacenadas a largo plazo y no se observó liberación alguna de proteínas de las nanopartículas SP-OA. Para confirmar que no se liberaron cantidades significativas de rMip de las nanopartículas, el sobrenadante de cada muestra obtenido tras centrifugación fue recuperado y se determinó el contenido de proteína del sobrenadante por triplicado utilizando el ensayo de BCA. Después de nueve meses de almacenamiento de las nanopartículas a temperatura ambiente, la asociación de la rMip con las nanopartículas SP-OA fue del 97% con respecto a la cantidad inicial de antígeno empleado.

10 **Ejemplo 4: Evaluación de la estabilidad del sistema: análisis de las propiedades del sistema (tamaño, polidispersión, morfología esférica y carga superficial (potencial ζ)).**

La evolución del tamaño de partícula fue determinado después de tres, seis y nueve meses bajo diferentes condiciones de almacenamiento de las muestras tanto frescas como liofilizadas. El tamaño de partícula de los sistemas liofilizados fue determinado resuspendiendo la muestra liofilizada en agua Milli-Q seguida de una agitación en vortex (t=0). El tamaño inicial fue 328 nm, y las nanopartículas presentaron una carga superficial negativa de -20 mV. Como podemos observar en la Tabla 2, transcurrido este tiempo a diferentes condiciones de almacenamiento, las formulaciones fueron capaces de preservar su tamaño nanométrico y su carga superficial negativa.

Meses	Muestra	Diámetro (nm)	Polidispersión	ζ Potencial (mV)
0 meses	Lio	328 \pm 12	0,2	-20 \pm 1
	4°C	317 \pm 5	0,2	-19 \pm 1
9 meses	Lio 4°C	337	0,3	-19
	Lio TA	371 \pm 42	0,3	-8 \pm 2
	4°C	327 \pm 7	0,2	-20 \pm 1

Tabla 2

A mayores, la morfología de las nanopartículas asociando la proteína MIP, fue analizada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) usando para ello un microscopio

electrónico de transmisión Philips CM12, a 60 kV de voltaje de aceleración y con una resolución de 0.3 nm.

5 Las imágenes fueron tomadas empleando una cámara MEGA VIEW-II DOCU. En la Figura 2 podemos apreciar una población homogénea de nanopartículas esféricas con un tamaño nanométrico similar al obtenido a t=0 (antes de ser liofilizadas) determinado por la técnica de dispersión de luz.

Ejemplo 5: propiedades inmunológicas del sistema nanopartículas-antígeno

10

5.1. Confirmación de la capacidad de la rMip de producir anticuerpos tras su asociación a las nanopartículas.

15 Para los estudios de inmunización se emplearon ratones hembra de seis semanas ICR (Swiss) inmunizados por inyección intraperitoneal siguiendo un protocolo de tres inmunizaciones a intervalos de 14 días. Cada muestra de suero se obtuvo a partir de ocho ratones. Los ratones se sangraron cinco días después de la tercera dosis y la sangre se dejó coagular. Los sueros fueron inactivados por calos (56 °C, 30 min) y almacenados en alícuotas de 300 µl a -80 °C hasta su uso en los subsiguientes análisis. Todos los protocolos fueron aprobados por la Comisión Ética de la Universidad de Santiago de

20 Compostela. Cada dosis para la obtención de los sueros anti-Mip y anti-NPMip contenía 5 µg de la proteína rMip diluida en 100 µl de agua. Para la obtención del suero anti-NPMipAl cada dosis contenía 5 µg de la proteína rMip diluida en 50 µl de agua y 50 µl of Al(OH)₃ mezclado por pipeteo durante 5 min. Un suero anti-NP se empleó como control para todos los ensayos. Como se muestra en la Figura 3 para evaluar la funcionalidad de los

25 anticuerpos producidos tras la inmunización para la formulación de nanopartículas-Mip administrada con Al(OH)₃ se obtuvieron dos sueros, uno tras la administración de la formulación fresca como antígeno y el otro empleando el producto liofilizado tras su almacenamiento nueve meses a 4 °C .

30 Para confirmar la capacidad de la rMip de producir anticuerpos tras su asociación a las nanopartículas, se realizó un análisis por Western Blotting. Las proteínas presentes en vesículas de membrana externa de la cepa H44/76 (18 µg/carril) se transfirieron del gel de la electroforesis SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa (0.45 µm; Bio-Rad, Richmond, CA, USA) empleando un Bio-Rad Mini-TransBlot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad

35 Chemical S.A., Spain) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las membranas se bloquearon durante 1 h con TBS conteniendo un 5% de Blotto® (Bio-Rad, Richmond, CA,

USA) y se incubaron toda la noche a 37 °C en una solución con cada suero teste a dilución 1:10000. Finalmente, las membranas se incubaron 90 min a 37 °C con una dilución 1:1000 de anti-inmunoglobulinas de ratón polivalentes conjugados a peroxidasa (Sigma–Aldrich, USA) y se reveló con PBS/H₂O₂/4-cloro-1-naftol. Se emplearon sueros anti-NP y anti-Mip como controles negativos y positivos respectivamente. La reactividad observada en el Western-blot (Figura 4) confirmó la capacidad de la rMip de producir anticuerpos tras su asociación a las nanopartículas SP-OA.

5.2. Confirmación de la capacidad del sistema de producir anticuerpos funcionales.

Ensayos de deposición de complemento y opsonofagocitosis: la deposición de los factores del complemento C3b/iC3b y C5b-9 (complejo de ataque a la membrana (MAC)) en la superficie de las cepas del meningococo y la actividad opsonofagocítica de los sueros fueron determinadas por citometría de flujo realizada en placas de 96 pocillos de fondo en U. Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6. Para los ensayos de deposición de complemento se incubaron células bacterianas inactivadas con 0.2% (p/v) de acida sódica y 17 µg/mL⁻¹ de fenilmetilsulfonil fluoruro durante 48 h con los sueros test inactivados por calor y plasma humano sin IgG. Para la detección de la deposición de componentes del complemento mediada por anticuerpos se emplearon anticuerpos de oveja anti-C3c (Abcam, UK) y anti-C5b-9 (Quidel, USA) humanos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para el ensayo de opsonofagocitosis, bacterias preteñidas internamente con 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y -6)-carboxifluoresceína (BCECF) acetoximethyl ester (Life technologies, UK) y fijadas con 0,2% (p/v) de acida sódica y 17 µg/mL⁻¹ de fenilmetilsulfonil fluoruro durante 48 h se mezclaron e incubaron con células HL-60 diferenciadas a granulocitos con 0,8% N,N Dimetilformamida (Sigma, UK) en presencia de los sueros test y complemento humano sin IgG. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Beckman Coulter FC500 (Beckman Coulter Ltd, High Wycombe, UK). Se establecieron ventanas de análisis horizontales en el canal de FITC para las muestras del control de solo complemento, sin anticuerpos, incluyendo aproximadamente el 10% de la población. Se midieron un total de 7500 células para cada muestra. Se calculó el índice de fluorescencia (FI) multiplicando el porcentaje de células que mostraron fluorescencia FITC en la ventana de análisis apropiada (% *gate*) por la fluorescencia media de la población de la ventana de análisis. El valor FI-C' mostrado se calculó extrayendo el valor de FI del control de solo complemento, sin anticuerpos. El ensayo se realizó por duplicado para todos los sueros teste y control.

Los sueros anti nanopartículas asociando la MIP permiten la opsonofagocitosis y la deposición de factores del complemento en la superficie del meningococo de las cepas

empleadas, de modo que se produce una respuesta de reactividad cruzada. Es destacable la elevada respuesta en el ensayo de deposición de C3b/iC3b y MAC (frente a la cepa homologa y las heterólogas) producida por el suero anti-NP-MIP no solo en comparación a la producida por el antígeno libre, sino también con respecto a la formulación que contienen el adyuvante convencional Al(OH)₃ (alum) al inmunizar. El hecho de que el sistema pueda actuar en sí mismos como adyuvante y la alta respuesta obtenida con respecto a la obtenida al emplear el adyuvante convencional alum convierten a este sistema en una buena alternativa para el desarrollo de una vacuna más eficaz y bien tolerada.

10 Los ensayos de actividad bactericida se realizaron empleando la cepa homóloga de *N. meningitidis* H44/76. Para los ensayos se empleó complemento de cría de conejo (Cedarlane, Canada) adsorbido frente a la cepa empleada. Brevemente, 50 µl de las correspondientes dilución seriada 1:2 de cada suero teste previamente inactivado por calor se mezclaron con 25 µl de complemento (concentración final del 12.5%) en los pocillos de
15 placas de microtitulación y se incubaron durante 60 min a 37 °C. Quince microlitros de cada mezcla, a tiempo 0 y tiempo 60 min, se depositaron en la superficie de placas de medio GC que a continuación se inclinaron para que las gotas se deslicen formando líneas verticales y se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmosfera con un 5 % de CO₂. Se incluyeron controles negativos en los que el suero inmune, el complemento o ambos fueron substituidos por
20 tampón GBSS. Se realizaron al menos dos ensayos en días diferentes incluyendo dos replicas en cada ensayo. La actividad bactericida se expresa como el porcentaje de la reducción media del número de unidades formadoras de colonias (CFUs) a tiempo 60 min respecto al tiempo 0. Una reducción en el número de CFUs superior al 50% a dilución del suero 1:8 fue considerada indicativa de actividad bactericida significativa.

25 La tabla 3 muestra que todas las formulaciones indujeron la formación de anticuerpos bactericidas frente a la cepa homóloga y mostraron la funcionalidad de los anticuerpos producidos por la Mip asociada a las nanopartícula SP-OA tras nueve meses de almacenamiento como producto liofilizado.

30 .
Tabla 3. Actividad bactericida de los sueros obtenidos frente a las nanopartículas asociando la proteína MIP frente a la cepa homóloga H44/76. Los títulos se expresan como la correspondiente dilución más elevada en la cual se obtuvo una mortalidad superior al 50% (1:8 es el título mínimo considerado indicativo de una mortalidad significativa).

35

SUERO	Anti-NPMip	Anti-NPMipAI	Anti-NPMipAI9	Anti-Mip
TÍTULO	1/128	1/256	1/256	1/128
(Tasa de mortalidad)	(57,47%)	(61,93%)	(58,72%)	(59,75%)

Tabla 3

Ejemplo 6: Evaluación de la habilidad de las nanopartículas para desarrollar otras composiciones inmunogénicas.

5

Las nanopartículas preparadas usando monooleato de sorbitán (Span® 80) fueron usadas para asociar una molécula antigénica diferente como ingrediente activo, para el desarrollo de una nanovacuna. En el presente ejemplo, la proteína rPorB fue asociada a las nanopartículas compuestas por esteres de sorbitán para su uso como nanovacunas.

10

Concretamente, los sistemas nanoparticulares elaborados a base de Span® 80 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA fueron empleados para asociar dicha porina. Para ello, se usó esta porina a una concentración de 7 mg/ml en un medio Hepes 10 mM pH 7,4, 0,1% SDS, 0,02% Thiomersal. Para la asociación de la misma a las nanopartículas se diluyó en agua Milli-Q hasta una concentración de 1 mg/ml, y esta disolución se incorporó en un volumen de 200 µl a 200 µl de la suspensión de nanopartículas, manteniéndose el conjunto en un incubador a temperatura ambiente durante 90 minutos. Los resultados de la caracterización de los sistemas fueron los siguientes: Tamaño: 169 ± 2 nm y Potencial zeta: $+55 \pm 2$ mV. La eficacia de asociación de la proteína se calculó indirectamente a partir de la proteína libre recuperada en el sobrenadante, una vez fueron centrifugadas las nanopartículas (14000 rpm, 120 min, 4°C). La cantidad de proteína libre se determinó utilizando la técnica cuantitativa de BCA, obteniéndose un 97% de unión proteína-nanopartículas para la concentración de proteína de 1 mg/ml. Posteriormente se realizó un Dot Blott, técnica cualitativa que nos permite corroborar la unión proteína- nanopartículas, que de nuevo permitió confirmar dicha asociación nanopartículas-ingrediente activo.

15

20

25

Ejemplo 7: Eficacia de asociación de las nanopartículas.

La siguiente tabla muestra la eficacia de asociación de algunos antígenos, incluyendo MIP y PorA a nanosistemas, siendo un 80% la eficacia de asociación más alta lograda hasta la fecha.

30

Referencia	Formulación	Eficacia de asociación (%)
Freixeiro P et al (datos no publicados de nuestro propio grupo)	L- α -fosfatidilcolina/colesterol liposomas- rMip	65%
Freixeiro P et al, 2013. Int J Pharm	L- α - fosfatidilcolina/colesterol liposomas - rPorA/rPorB/rRmpM	80%
Carmenate T et al, 2001. Biotechnol. Appl. Biochem	dipalmitoil fosfatidilcolina y colesterol-rOpc	30%
Paolicelli P et al, 2010. Nanomedicine	PLGA-rHBsAg	30-44%
Fuenzalida JP, 2014. J Phys Chem B	Quitosan0/ poli(sodio 4-estirenosulfonato) (CS/PSS)- tres moléculas diferentes de bajo peso molecular (LMWM)	45, 21, and 12%
Mali N et al, 2014. <u>AAPS PharmSciTech</u>	serratiopeptidasa (SER)- nanopartículas cargadas con quitosano (CS)	80%

Tabla 4

Sorprendentemente, las nanopartículas de la invención son capaces de proporcionar valores de eficacia de asociación superiores en una amplia gama de concentraciones de MIP por ml de suspensión de nanopartículas (es decir, de 100 μ g a 3 mg). Concretamente, las medidas indirectas después de la centrifugación de la suspensión de nanopartículas-antígeno no mostraron proteína en el sobrenadante en todas las concentraciones utilizadas, confirmando un 100% de antígeno asociado a las nanopartículas. Las mismas nanopartículas también mostraron una eficacia muy alta de asociación con el antígeno PorB (97%). Por lo tanto podemos concluir que esta inesperada eficacia de asociación tan elevada puede ser obtenida cuando se compara con estudios previos nuestros y otros estudios descritos en la literatura usando liposomas o diferentes nanopartículas.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende una nanopartícula que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100% asociada a una secuencia de aminoácidos que comprende la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP).
- 10 2. La composición según la reivindicación anterior donde la proteína MIP es una proteína recombinante.
3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la proteína MIP tiene una secuencia con al menos el 50% de identidad con la secuencia Seq ID No: 1.
- 15 4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde la proteína MIP tiene una secuencia con al menos el 90% de identidad con la Secuencia ID No:1.
- 20 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde la proteína MIP consiste en la secuencia de Secuencia ID No:1.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende uno o más antígenos además de la proteína MIP.
- 25 7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las nanopartículas están caracterizadas por ser una matriz homogénea, el tamaño medio de las cuales está comprendido entre 50 y 600 nm.
- 30 8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el éster de sorbitán se selecciona del grupo que consiste en mono-, di-, tri- o sesqui-oleato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-laurato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-palmitato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-estearato de sorbitán; y mono-, di-, tri- o sesqui-isoestearato de sorbitán, y sus combinaciones.
- 35 9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la nanopartícula además comprende una sustancia catiónica.

10. La composición según la reivindicación 9, donde la sustancia catiónica se selecciona de sales amónicas, polímeros catiónicos y aminos grasas o lipofílicas.
- 5 11. La composición según la reivindicación 9, donde la sustancia catiónica se selecciona de entre betaína, protamina, ácido poliglutámico, dextrano cationizado, pullulan cationizado, poliaminoácidos, proteínas cationizadas, polisacáridos cationizados, una combinación de los mismos y sus sales.
- 10 12. La composición según la reivindicación 9, donde la sustancia catiónica es oleilamina.
13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición está en forma liofilizada.
- 15 14. Una composición farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 15. Una composición vacunal que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
16. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para la fabricación de una composición vacunal para tratar o prevenir una infección de *N. meningitidis* y/o *Neisseria gonorrhoeae*.
- 25 17. El uso según la reivindicación 16, donde la composición vacunal se usa para la prevención de una infección de *N. meningitidis* serogrupo B y/o serogrupo A y/o serogrupo C y/o serogrupo W135 y/o serogrupo Y.
- 30 18. Un kit para uso en la inducción de una respuesta inmune en un organismo, que comprende una composición inmunogénica o vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y opcionalmente instrucciones relacionadas con la administración.

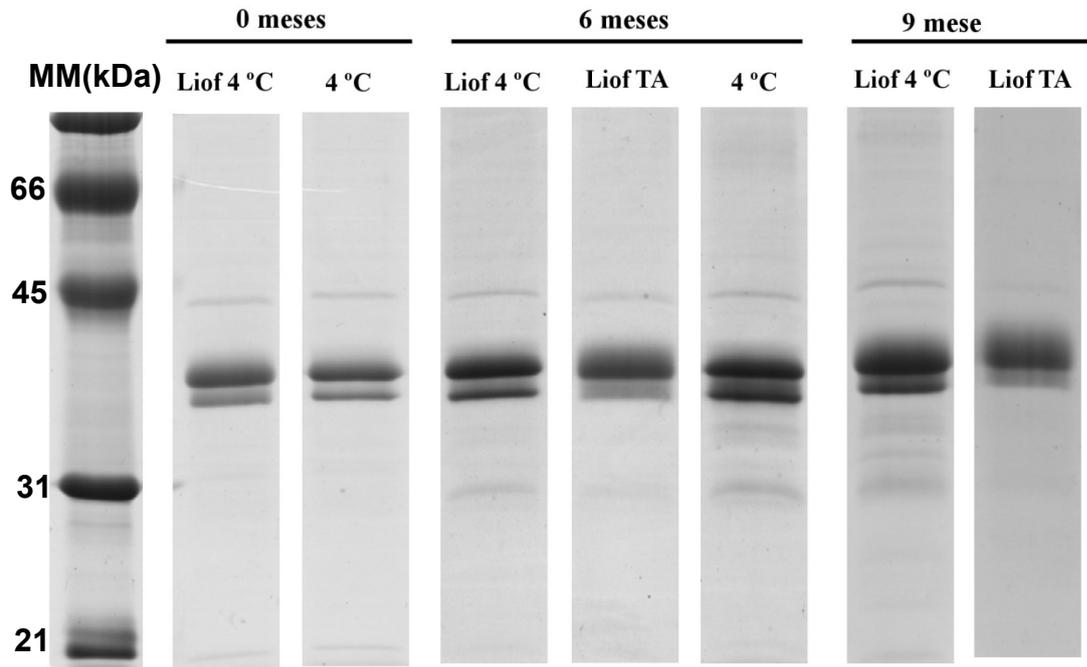


Fig. 1

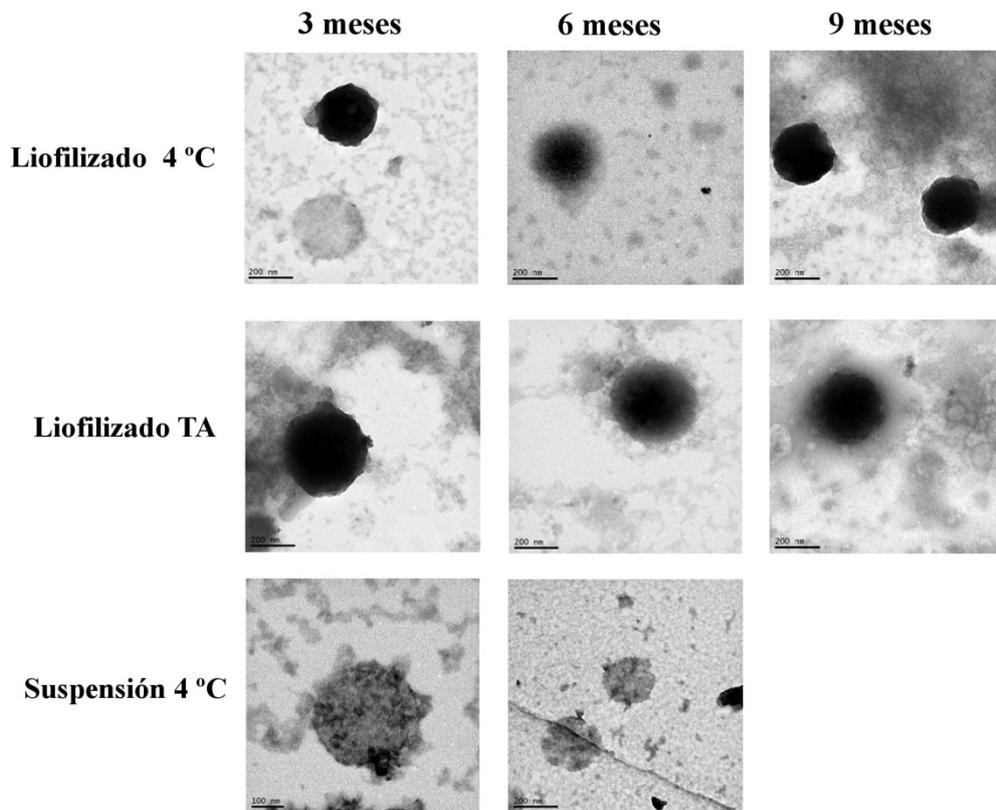


Fig. 2

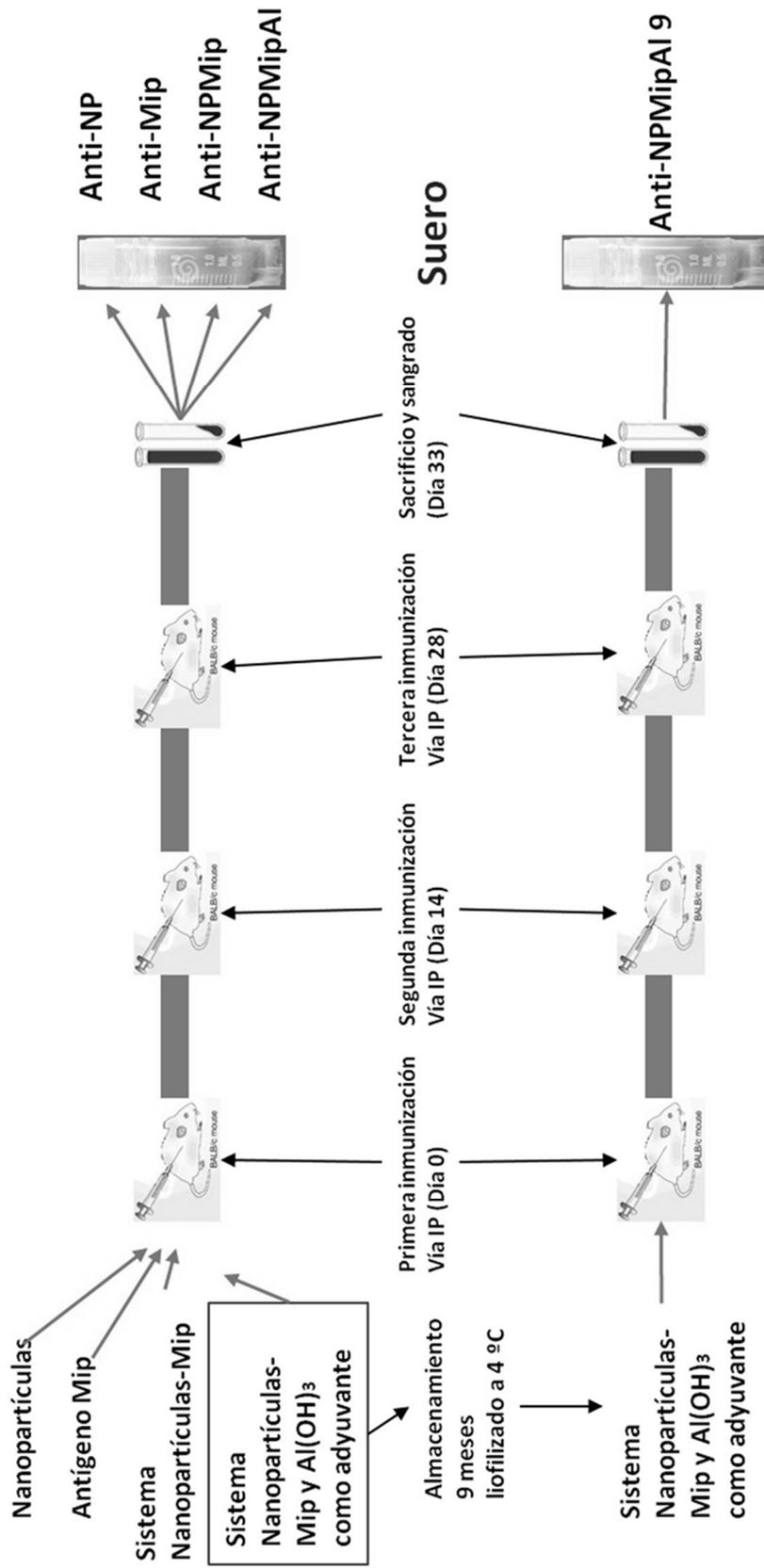
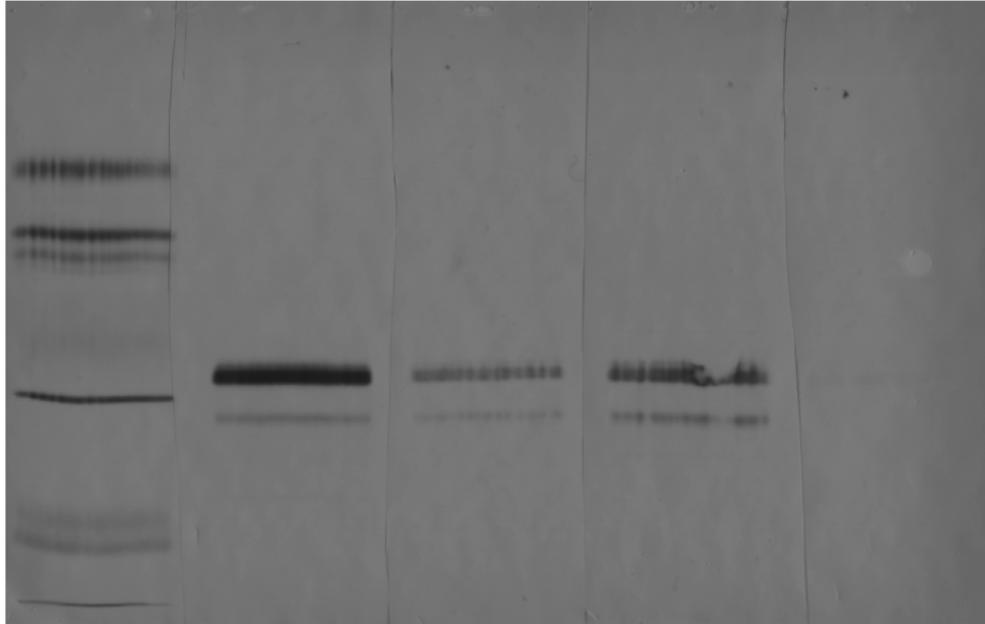


Fig. 3

Dilución 1:10000



Marcadores de masa molecular biotinilados

Anti-NPMip Al

Anti-NPMip

Anti-Mip

Anti-NP

Fig. 4

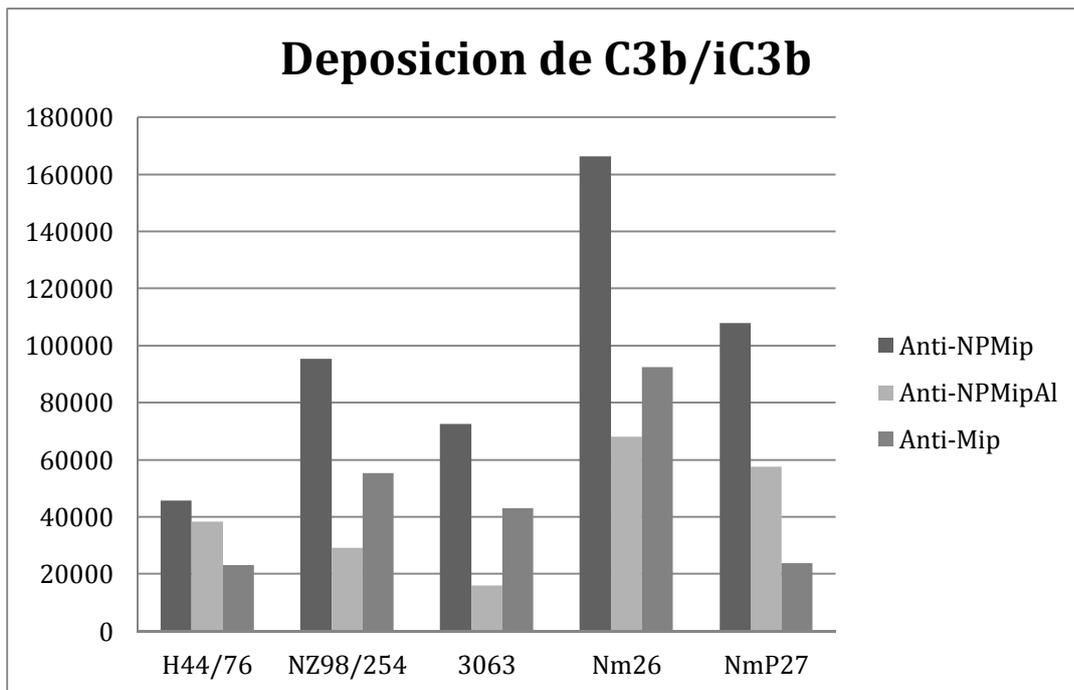


Fig. 5

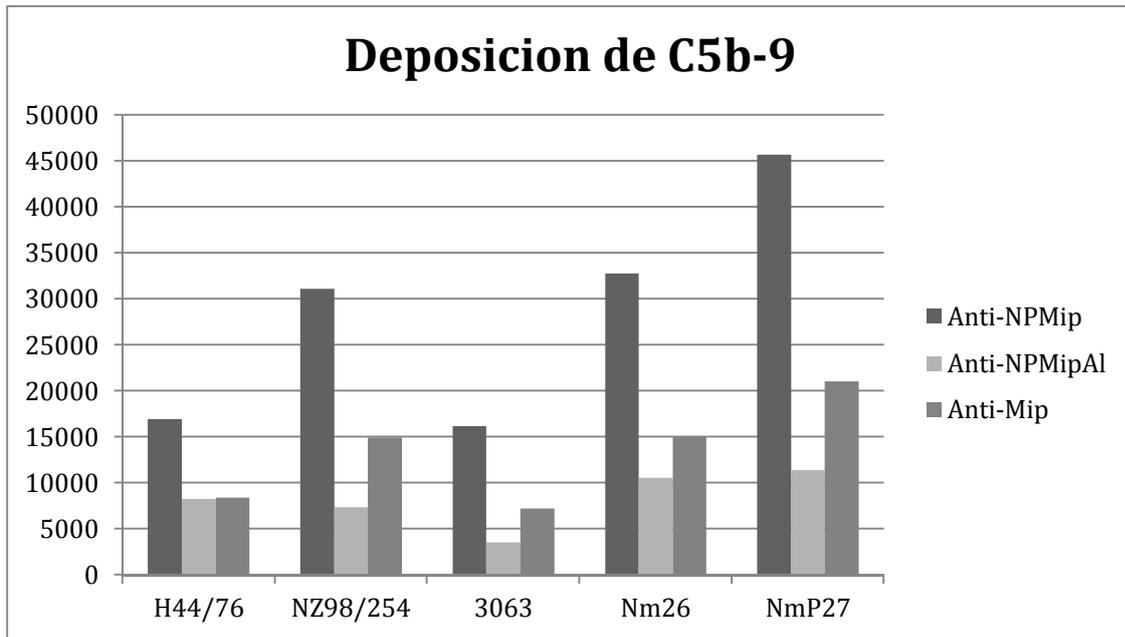


Fig. 6

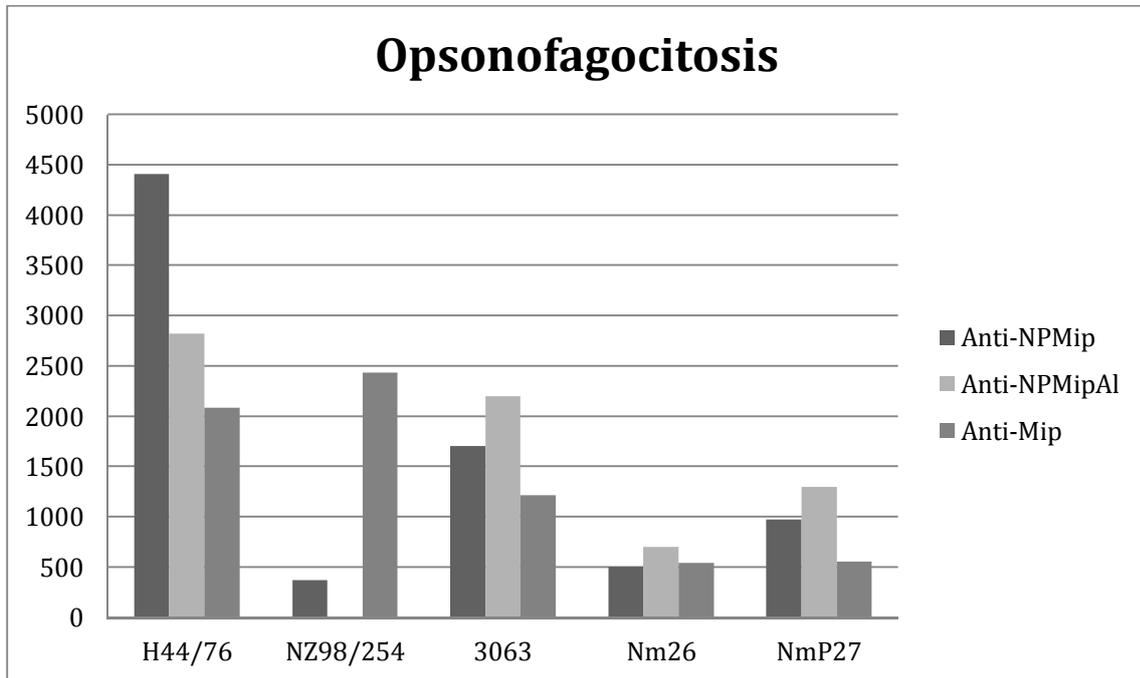


Fig. 7

ES 2 535 559 B2

Listado de Secuencias

<110> Universidade de Santiago de Compostela
 <120> Composición inmunogénica de nanopartículas que comprende el potenciador de la infectividad a macrófagos (MIP)
 <130> 900470
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Neisseria MC58

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(272)

<400> 1

Met Asn Thr Ile Phe Lys Ile Ser Ala Leu Thr Leu Ser Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Ser Ala Cys Gly Lys Lys Glu Ala Ala Pro Ala Ser Ala Ser
 20 25 30

Glu Pro Ala Ala Ala Ser Ser Ala Gln Gly Asp Thr Ser Ser Ile Gly
 35 40 45

Ser Thr Met Gln Gln Ala Ser Tyr Ala Met Gly Val Asp Ile Gly Arg
 50 55 60

Ser Leu Lys Gln Met Lys Glu Gln Gly Ala Glu Ile Asp Leu Lys Val
 65 70 75 80

Phe Thr Glu Ala Met Gln Ala Val Tyr Asp Gly Lys Glu Ile Lys Met
 85 90 95

Thr Glu Glu Gln Ala Gln Glu Val Met Met Lys Phe Leu Gln Glu Gln
 100 105 110

Gln Ala Lys Ala Val Glu Lys His Lys Ala Asp Ala Lys Ala Asn Lys
 115 120 125

Glu Lys Gly Glu Ala Phe Leu Lys Glu Asn Ala Ala Lys Asp Gly Val
 130 135 140

Lys Thr Thr Ala Ser Gly Leu Gln Tyr Lys Ile Thr Lys Gln Gly Glu
 145 150 155 160

Gly Lys Gln Pro Thr Lys Asp Asp Ile Val Thr Val Glu Tyr Glu Gly
 165 170 175

ES 2 535 559 B2

Arg Leu Ile Asp Gly Thr Val Phe Asp Ser Ser Lys Ala Asn Gly Gly
180 185 190

Pro Val Thr Phe Pro Leu Ser Gln Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly
195 200 205

Val Gln Leu Leu Lys Glu Gly Gly Glu Ala Thr Phe Tyr Ile Pro Ser
210 215 220

Asn Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Gly Ala Gly Asp Lys Ile Gly Pro Asn
225 230 235 240

Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Lys Leu Val Lys Ile Gly Ala Pro Glu
245 250 255

Asn Ala Pro Ala Lys Gln Pro Ala Gln Val Asp Ile Lys Lys Val Asn
260 265 270



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201431336

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.09.2014

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K39/095** (2006.01)
B82Y5/00 (2011.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2403544 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 20.05.2013, todo el documento.	1-18
A	WO 2012032358 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON) 15.03.2012, todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
04.05.2015

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSI, EMBASE, EMBL ALL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.05.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2403544 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA)	20.05.2013
D02	WO 2012032358 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON)	15.03.2012

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en una composición inmunogénica que comprende una nanopartícula de éster de sorbitán en una proporción en peso entre 60% y 100% asociada a una secuencia de aminoácidos que comprende la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP) (reivindicaciones 1-13).

La presente solicitud de invención también consiste en una composición farmacéutica que comprende la composición anteriormente reivindicada junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable (reivindicación 14), una composición vacunal que comprende la composición inmunogénica anteriormente reivindicada (reivindicación 15), el uso de dicha composición (reivindicaciones 16) y un kit para el uso en la inducción de una respuesta inmune en un organismo (reivindicación 18).

El documento D01 se considera el más representativo del estado de la técnica, y consiste en un sistema de nanopartículas a base de ésteres de sorbitán en proporción 60%- 100% en peso. Dichas nanopartículas están caracterizadas por ser una matriz homogénea, de un tamaño medio entre 50 y 600 nm y pueden contener una sustancia catiónica (ver todo el documento).

La invención reivindicada difiere principalmente del documento D01 en que el documento D01 no divulga la composición inmunogénica formada por la nanopartícula asociada a una secuencia de aminoácidos que comprende la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP). Así, la invención reivindicada implica un efecto mejorado comparado con el estado de la técnica.

El documento D02 consiste en una composición inmunogénica que comprende la proteína potenciadora de la infectividad a macrófagos (MIP) y una composición farmacéutica o vacuna que comprende dicha proteína (ver todo el documento).

El documento D02 difiere de la presente solicitud de invención en que el documento D02 no divulga nanopartículas de ésteres de sorbitán como parte de la composición inmunogénica.

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

1.1.- Reivindicaciones 1-18.

No sería obvio para una persona experta en la materia aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención como se revela en las reivindicaciones 1-18.

Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-18 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.