

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 504**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2010 PCT/IB2010/000733**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10109323**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010 E 10713516 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2411048**

54 Título: **Proteína de enlace del factor H meningocócico utilizada como adyuvante**

30 Prioridad:

24.03.2009 US 162999 P

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

02.12.2020

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**CONTORNI, MARIO y
TARLI, LORENZO**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 797 504 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

Proteína de enlace del factor H meningocócico utilizada como adyuvante

5 **CAMPO TÉCNICO**

[0001] Esta invención pertenece al campo de las vacunas contra el meningococo, en particular las que contienen el antígeno fHBP.

10 **ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA**

[0002] *Neisseria meningitidis* (meningococo) es una bacteria esférica gramnegativa. Las vacunas meningocócicas actuales también se basan en sacáridos capsulares. Estos incluyen las vacunas conjugadas monovalentes de serogrupo C y las mezclas conjugadas de 4-valente para los serogrupos A, C, W135 e Y. Actualmente no existe una vacuna útil autorizada para uso general contra el serogrupo B ('MenB').

[0003] Un antígeno que se ha propuesto para su uso en la inmunización contra MenB es la proteína de unión al factor H (fHBP). Este antígeno también se ha denominado proteína '741' (SEQ IDs 2535 y 2536 en la ref. 34), 'NMB1870', 'GNA1870' [refs. 1-3], 'P2086', 'LP2086' u 'ORF2086' [4-6]. La proteína ha sido bien estudiada. Es naturalmente una lipoproteína y se expresa en todos los serogrupos meningocócicos. La estructura del dominio inmunodominante C-terminal de fHbp ('fHbpC') ha sido determinada por RMN [7]. Esta parte de la proteína forma un barril β de ocho cadenas, cuyas cadenas están conectadas por bucles de longitudes variables. El barril está precedido por una hélice α corta y una cola N-terminal flexible.

[0004] El antígeno fHBP se divide en tres variantes distintas [8] y se ha encontrado que el suero producido contra una familia dada es bactericida dentro de la misma familia, pero no es activo contra las cepas que expresan una de las otras dos familias, es decir, hay protección cruzada entre familias, pero no protección cruzada entre familias. Por lo tanto, la referencia 8 propone combinar diferentes variantes de fHBP en una única composición de vacuna, aumentando así la cobertura de la cepa, ya sea como una mezcla de proteínas separadas o como una proteína de fusión de las diferentes variantes (estas últimas son 'proteínas en tándem').

[0005] La referencia 9 también informa una proteína tándem fHBP (páginas 18-19 de la referencia 9). Esta proteína en tándem se purificó y se mezcló con fosfato de aluminio como adyuvante, pero se informa que no se adsorbe bien al adyuvante. Es deseable una buena adsorción de los antígenos, y se ha encontrado que tales proteínas fHBP mixtas se adsorben fácilmente si se usa hidróxido de aluminio como adyuvante.

[0006] Sin embargo, un problema cuando se usa hidróxido de aluminio como adyuvante es que puede degradar ciertos antígenos. Por ejemplo, la referencia 10 informa que puede hidrolizar vacunas conjugadas de *H. influenzae* tipo B, incluso a bajas temperaturas, lo que conduce a una eficacia reducida. De manera similar, la hidrólisis del sacárido capsular de *S. typhi* Vi en presencia de hidróxido de aluminio se informa en la referencia 11. Por lo tanto, puede ser deseable formular antígenos usando un adyuvante basado en fosfato de aluminio, particularmente si la vacuna adyuvante puede mezclarse (ya sea durante la fabricación o en el momento del uso) con un antígeno que puede ser susceptible al daño por un hidróxido de aluminio, p. ej., un sacárido capsular bacteriano conjugado.

[0007] Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar formulaciones de fHBP, y en particular de múltiples variantes de fHBP, en las que las fHBP se adsorben a un adyuvante pero que no requieren hidróxido de aluminio.

[0008] Abstract P100 (Anderson *et al.*) de presentaciones realizadas en la Decimosexta IPNC en Rotterdam en 2008 informa sobre la inmunogenicidad de una vacuna experimental que contiene dos proteínas fHBP lipidadas recombinantes que representan la secuencia de subfamilias A y B, junto con un adyuvante de fosfato de aluminio. Los macacos de *Cynomolgus* se inmunizaron por vía intramuscular con proteínas rLP2086 (A + B) adsorbidas en AIPO4 a varias dosis de proteínas. Los autores concluyen que (i) la vacuna produce anticuerpos bactericidas específicos de la subfamilia, y (ii) la inmunogenicidad se mejoró con la inclusión del adyuvante.

55 **DIVULGACIÓN DE LA INVENCIÓN**

[0009] Los inventores han identificado técnicas generales para lograr la adsorción eficiente de proteínas fHBP a adyuvantes de hidroxifosfato de aluminio. El uso de hidroxifosfato de aluminio puede evitar la necesidad de usar hidróxido de aluminio, y las técnicas de los inventores evitan la adsorción ineficiente descrita en la referencia 9. Las técnicas de adsorción son particularmente útiles para composiciones que incluyen múltiples variantes de fHBP.

[0010] La invención proporciona:

- Un método para la adsorción de dos antígenos meningocócicos fHBP diferentes a un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio para dar una composición inmunogénica, en donde (i) ambos de los antígenos de fHBP meningocócicos tienen un punto isoeléctrico entre 5,0 y 7,0, (ii) el adyuvante de hidroxifosfato de

aluminio tiene un punto de carga cero entre 5,0 y 7,0, y (iii) la adsorción de ambos antígenos fHBP tiene lugar a un pH entre 5,0 y 7,0 en presencia de un tampón.

- Una composición inmunogénica que comprende dos antígenos meningocócicos fHBP diferentes, ambos adsorbidos al adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en donde (i) ambos antígenos meningocócicos fHBP tienen un punto isoeléctrico entre 5,0 y 7,0, (ii) el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene un punto de carga cero entre 5,0 y 7,0, y (iii) la composición incluye un tampón para mantener el pH en el rango de 5,0 a 7,0.

[0011] La adsorción de fHBP tiene lugar a un pH que es igual o inferior al punto de carga cero (PZC) del hidroxifosfato de aluminio. Por lo tanto, para un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio dado, se seleccionaría un medio acuoso (p. ej., tampón) con un pH igual o inferior al PZC del adyuvante. Por el contrario, para un pH dado, se seleccionaría un hidroxifosfato de aluminio que tenga el mismo o mayor PZC. Esta selección de pH y PZC puede dar composiciones inmunogénicas en las que fHBP se adsorbe de manera estable a un hidroxifosfato de aluminio.

[0012] En el método de la invención, se seleccionan un fHBP y un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio de manera que el fHBP tenga un punto isoeléctrico (pi) dentro del rango de 5,0 a 7,0 (inclusive) y el PZC del adyuvante se seleccione dentro del mismo rango. Al garantizar esta estrecha coincidencia de antígeno y características adyuvantes, es posible obtener composiciones adsorbidas estables incluso si el pH de adsorción está por encima del PZC del adyuvante. La adsorción estable se ve facilitada por la presencia de un tampón que puede mantener el pH también en el intervalo de 5,0 a 7,0.

[0013] Si un fHBP tiene un punto isoeléctrico por encima del PZC de un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, se agrega un tampón para llevar el pH a dentro de 1,2 unidades de pH del PZC.

[0014] En un método para adsorber un antígeno fHBP meningocócico a un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en donde la adsorción tiene lugar a un pH que es igual o inferior al punto de carga cero del hidroxifosfato de aluminio. El antígeno fHBP adsorbido puede usarse como inmunógeno. La adsorción se puede realizar de varias maneras. La mezcla de antígeno fHBP, hidroxifosfato de aluminio y un tampón puede ocurrir en cualquier orden adecuado, ya sea combinando los tres componentes por separado o mezclando previamente dos componentes y luego mezclando la mezcla previa con el tercer componente.

[0015] En una composición inmunogénica que comprende un antígeno meningocócico fHBP y un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en donde el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene un punto de carga cero que es mayor que el pH de la composición inmunogénica.

[0016] En un método para adsorber un antígeno fHBP meningocócico a un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en donde el antígeno fHBP meningocócico tiene un punto isoeléctrico que es mayor que el punto adyuvante de carga cero, entonces la composición puede tener un pH que está dentro de 1,2 unidades pH del punto de carga cero del adyuvante. La composición puede incluir un tampón que mantiene el pH dentro de 1,2 unidades pH del PZC del adyuvante.

[0017] En una composición inmunogénica que comprende un antígeno de fHBP meningocócico adsorbido a un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, donde el antígeno de fHBP meningocócico tiene un punto isoeléctrico que es mayor que el punto de carga cero del adyuvante entonces la composición puede tener un pH que está dentro de 1,2 pH unidades del punto adyuvante de carga cero. La composición puede incluir un tampón que mantiene el pH dentro de 1,2 unidades de pH del PZC del adyuvante.

[0018] Las composiciones de la invención incluyen más de un fHBP. Como se mencionó anteriormente, se ha informado previamente que tales composiciones no se adsorben bien a los adyuvantes de aluminio con grupos fosfato.

[0019] La adsorción de dos antígenos fHBP puede tener lugar a un pH que es igual a o por debajo del punto de carga cero del hidroxifosfato de aluminio. Los antígenos fHBP adsorbidos pueden usarse para la inmunización meningocócica de amplio espectro. La mezcla de los antígenos fHBP y el hidroxifosfato de aluminio (y un tampón) puede ocurrir en cualquier orden adecuado.

[0020] En las composiciones de la invención, cada antígeno fHBP es preferiblemente al menos 85% adsorbido, como se describe en más detalle a continuación.

Proteína(s) de unión a Factor H

[0021] Las composiciones de la invención incluyen dos diferentes antígenos meningocócicos de proteína de unión a factor H (fHBP). Estas son preferiblemente variantes diferentes como se describe en la referencia 8. Diferentes fHBP generarán respuestas inmunes distintas que no son completamente reactivas y que proporcionan un espectro más amplio de cobertura de cepas contra meningococos.

[0022] Una composición de la invención puede comprender dos de los siguientes:

- (a) un primer polipéptido que comprende una primera secuencia de aminoácidos, en donde la primera secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos un % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 1 y/o (ii) que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1;
- (b) un segundo polipéptido, que comprende una segunda secuencia de aminoácidos, donde la segunda secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos un % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y/o (ii) que consiste en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2;
- (c) un tercer polipéptido, que comprende una tercera secuencia de aminoácidos, donde la tercera secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos un % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y/o (ii) que consiste en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 3.

[0023] Así, una composición puede comprender: (i) un primer y segundo polipéptido como se define anteriormente; (ii) un primer y tercer polipéptido como se definió anteriormente; o (iii) un segundo y tercer polipéptido como se definió anteriormente. Se prefiere una combinación de un primer y tercer polipéptido. Se prefiere una combinación en la que cada uno de los dos antígenos fHBP meningocócicos diferentes tiene un pl entre 5,0 y 7,0, y en particular cuando ambos tienen un pl en el rango de 5,0 a 6,0 o en el rango de 5,2 a 6,2.

[0024] Dos diferentes antígenos de fHBP meningocócicos pueden compartir algunas secuencias en común, pero los primeros, segundos y terceros polipéptidos tienen diferentes secuencias de aminoácidos fHBP.

[0025] Un polipéptido que comprende la primera secuencia de aminoácido, cuando se administra a un sujeto, obtendrá un anticuerpo de respuesta que comprende anticuerpos que se unen a la proteína de meningococos de tipo salvaje que tiene naciente secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 (MC58). En algunas realizaciones, algunos o todos estos anticuerpos no se unen a la proteína de meningococo de tipo salvaje que tiene la secuencia de aminoácidos naciente SEQ ID NO: 21 ni a la proteína de meningococo de tipo salvaje que tiene la secuencia de aminoácidos naciente SEQ ID NO: 22.

[0026] Un polipéptido que comprende la segunda secuencia de aminoácidos, cuando se administra a un sujeto, provocará una respuesta de anticuerpos que comprende anticuerpos que se unen a la proteína de meningococos de tipo salvaje que tiene naciente secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 21 (2996). En algunas realizaciones, algunos o todos estos anticuerpos no se unen a la proteína de meningococo de tipo salvaje que tiene la secuencia de aminoácidos naciente SEQ ID NO: 20 o a la proteína de meningococo de tipo salvaje que tiene la secuencia de aminoácidos naciente SEQ ID NO: 22.

[0027] Un polipéptido que comprende la tercera secuencia de aminoácido, cuando se administra a un sujeto, obtendrá un anticuerpo de respuesta que comprende anticuerpos que se unen a la proteína de meningococos de tipo salvaje que tiene naciente secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 (M1239). En algunas realizaciones, algunos o todos estos anticuerpos no se unen a la proteína de meningococo de tipo salvaje que tiene la secuencia de aminoácidos naciente SEQ ID NO: 20 o a la proteína de meningococo de tipo salvaje que tiene la secuencia de aminoácidos naciente SEQ ID NO: 21.

[0028] En algunas realizaciones, el fragmento de al menos x contiguos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 no es también presente dentro de la SEQ ID NO: 2 o dentro de SEQ ID NO: 3. De manera similar, el fragmento de al menos y contiguos de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 podría no estar presente también dentro de SEQ ID NO: 1 o dentro de SEQ ID NO: 3. De manera similar, el fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 3 también podría no estar presente dentro de SEQ ID NO: 1 o dentro de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, cuando dicho fragmento de uno de SEQ ID NOs: 1 a 3 se alinea como una secuencia contigua contra los otros dos SEQ ID NOs, la identidad entre el fragmento y cada uno de los otros dos SEQ ID NOs es menor que 75%, por ejemplo menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, *etc.*

[0029] El valor de a es de al menos 84 por ejemplo 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o más. El valor de b es al menos 84 p. ej. 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o más. El valor de c es al menos 84, por ejemplo, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o más. Los valores de a , b y c pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, a b y c son idénticos.

[0030] El valor de x es al menos 20 por ejemplo 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de y es al menos 20, por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de z es al menos 20, por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Los valores de x , y y z pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, x y y z son idénticos.

[0031] Los fragmentos comprenden preferiblemente un epítipo de la respectiva SEQ ID NO: secuencia. Otros

fragmentos útiles carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo N de la respectiva SEQ ID NO: mientras retienen al menos un epítipo de los mismos.

5 **[0032]** Las secuencias de aminoácidos utilizadas con la invención puede, en comparación con las SEQ ID NOs: 1, 2 o 3, incluir uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, *etc.*) reemplazos conservadores de aminoácidos, es decir, reemplazos de un aminoácido con otro que tiene una cadena lateral relacionada. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos, es decir, aspartato, glutamato; (2) básico, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polar, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar no cargado, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. Los polipéptidos pueden tener una o más deleciones de aminoácidos individuales (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, *etc.*) en relación con una secuencia de referencia. Los polipéptidos también pueden incluir una o más inserciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, *etc.*) (por ejemplo, cada uno de los aminoácidos 1, 2, 3, 4 o 5) en relación con una secuencia de referencia.

10 **[0033]** Una primera secuencia de aminoácidos útil tiene una identidad de al menos 85% (por ejemplo, >95% o 100%) a la SEQ ID NO: 1. Otra primera secuencia de aminoácidos útil tiene una identidad de al menos 95% (por ejemplo, >98% o 100%) a SEQ ID NO: 4. Otra primera secuencia de aminoácidos útil tiene al menos una identidad de 95% (por ejemplo, >98% o 100%) a SEQ ID NO: 5.

15 **[0034]** Una tercera secuencia de aminoácidos útil tiene una identidad de al menos 85% (por ejemplo, >95% o 100%) a la SEQ ID NO: 3. Otra tercera secuencia de aminoácido útil tiene una identidad de al menos 95% (por ejemplo, >98% o 100%) a SEQ ID NO: 6.

20 **[0035]** Combinaciones que comprenden una mezcla de secuencias primera y tercera basadas en SEQ ID NOs: 4 y 6 (o sus variantes cercanas) son particularmente útiles. Otra combinación útil comprende una mezcla de secuencias primera y tercera basadas en una mezcla de SEQ ID NOs: 5 y 6 (o sus variantes cercanas). Por lo tanto, una composición puede comprender un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25.

25 **[0036]** Una composición de la invención puede ser una composición fHBP bivalente, o puede haber más de dos diferentes antígenos fHBP por ejemplo en una composición de fHBP trivalente o tetravalente.

30 **[0037]** En algunas realizaciones, los polipéptido(s) de fHBP están lipidados por ejemplo en una cisteína N-terminal. En otras realizaciones, sin embargo, los polipéptidos fHBP no están lipidados. Para las fHBP lipidadas, los lípidos unidos a las cisteínas generalmente incluirán residuos de palmitoilo, por ejemplo, como tripalmitoilo-S-glicerilo-cisteína (Pam3Cys), dipalmitoilo-S-glicerilo cisteína (Pam2Cys), nacetilo (dipalmitoilo-S-glicerilo cisteína), *etc.* Ejemplos de las secuencias de fHBP lipidadas maduras son SEQ ID NO: 23 (incluida SEQ ID NO: 4), SEQ ID NO: 24 (incluida SEQ ID NO: 5), y SEQ ID NO: 25 (incluida SEQ ID NO: 6).

35 **[0038]** La administración de una fHBP obtendrá preferiblemente anticuerpos que pueden unirse a un polipéptido meningocócico consiste en secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Los antígenos fHBP ventajosos para el uso con la invención puede provocar anticuerpos anti-meningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

40 **[0039]** La cantidad total de un polipéptido fHBP por lo general será de entre 1 y 500 µg/dosis, por ejemplo entre 60 y 200 µg/dosis, o entre 120 y 500 µg/ml. Una cantidad de 20, 40, 50, 60, 80, 100 o 200 µg para cada polipéptido fHBP es típica en una dosis de vacuna humana. Por lo tanto, se puede formular una vacuna para incluir esta cantidad de cada fHBP.

45 **[0040]** Los diferentes antígenos fHBP meningocócicos pueden estar presentes como polipéptidos separados como se describe anteriormente (por ejemplo, un primer y segundo polipéptido) o pueden estar presentes como parte de un único 'híbrido' polipéptido es decir, donde al menos dos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) los antígenos fHBP se expresan como una cadena polipeptídica única, como se describe para los antígenos meningocócicos en la referencia 12.

50 **[0041]** Un polipéptido híbrido A puede comprender dos o tres de los siguientes: una primera secuencia de aminoácidos como se define anteriormente; una segunda secuencia de aminoácidos como se definió anteriormente; y/o una tercera secuencia de aminoácidos como se definió anteriormente.

55 **[0042]** Los polipéptidos híbridos pueden ser representados por la fórmula NH₂-A-{-X-L-}n-B-COOH, en donde: X es una primera, segunda o tercera secuencia de aminoácidos como se define anteriormente; L es una secuencia de aminoácidos enlazadora opcional; A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional; n es un entero de 2 o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, *etc.*). Usualmente n es 2 o 3, y al menos dos de una primera, segunda y tercera secuencia de aminoácidos están presentes.

[0043] Si un resto -X- tiene una secuencia de péptido líder en su forma de tipo salvaje, esto puede incluirse u omitirse en la proteína híbrida. En algunas realizaciones, los péptidos líderes se eliminarán, excepto el del resto -X- ubicado en el terminal N de la proteína híbrida, es decir, el péptido líder de X₁ se retendrá, pero los péptidos líderes de X₂... X_n será omitido. Esto es equivalente a eliminar todos los péptidos líderes y usar el péptido líder de X₁ como resto -A-.

[0044] Para cada n instancias de {-XL-}, enlazador de secuencia de aminoácidos -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando n = 2 el híbrido puede ser NH₂-X₁-L₁-X₂-L₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-L₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-L₂-COOH, etc. La(s) secuencia(s) de aminoácidos del enlazador -L- generalmente serán cortas (por ejemplo, 20 o menos aminoácidos, es decir, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos comprenden secuencias cortas de péptidos que facilitan la clonación, enlazadores de poli-glicina (es decir, que comprenden Gly_n donde n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), y las etiquetas de histidina (es decir, His_n donde n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos enlazadoras adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia. Un enlazador útil es GSGGGG (SEQ ID NO: 15) o GSGSGGGG (SEQ ID NO: 16), con el dipéptido Gly-Ser formado a partir de un sitio de restricción BamHI, ayudando así a la clonación y manipulación, y el tetrapéptido (Gly)₄ siendo un enlazador típico de poliglicina. Otro enlazador adecuado, en particular para su uso como el L_n final es un dipéptido Leu-Glu.

- A- es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional. Normalmente será corto (por ejemplo, 40 aminoácidos o menos, es decir, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias líderes para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, etiquetas de histidina, es decir, His_n donde n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos N-terminales adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia. Si X₁ carece de su propia metionina N-terminal, -A- es preferiblemente un oligopéptido (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) que proporciona una metionina N-terminal, por ejemplo, Met-Ala-Ser, o un solo residuo Met.

- B- es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional. Normalmente será corto (por ejemplo, 40 o menos aminoácidos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias cortas de péptidos que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, que comprenden etiquetas de histidina, es decir, His_n donde n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, como SEQ ID NO: 17), o secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácidos C-terminales adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia.

Adyuvantes de hidroxifosfato de aluminio y adsorción

[0045] Las composiciones de la invención incluyen un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio. Dichos adyuvantes a menudo se denominan por conveniencia como "fosfato de aluminio" [13], aunque los hidroxifosfatos se pueden distinguir del AlPO₄ estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a 3164 cm⁻¹ (por ejemplo, cuando se calienta a 200°C) indica la presencia de hidroxilos estructurales. El adyuvante de hidroxifosfato de aluminio puede contener una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio) y también puede incluir iones de sodio y/o cloruro [14]. El adyuvante 7 se puede obtener por precipitación.

[0046] El hidroxifosfato de aluminio no es un compuesto estequiométrico y su hidroxilo y composición de fosfato depende de los reactivos y las condiciones de precipitación. Esta composición de hidroxilo/fosfato afecta el punto de carga cero del adyuvante (PZC; el pH al que una superficie tiene carga neta cero). El PZC está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo (la relación molar P/Al). La sustitución de aniones fosfato por aniones hidroxilo disminuye el PZC. Por lo tanto, el PZC puede alterarse cambiando la concentración de iones fosfato libres en la solución (más fosfato = PZC más ácido) o agregando un tampón como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los hidroxifosfatos de aluminio usados con la invención generalmente tienen un PZC de entre 5,0 y 6,6, por ejemplo, entre 5,4 y 6,2.

[0047] La relación molar de P/Al de un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio generalmente será de entre 0,3 y 1,2, preferiblemente entre 0,8 y 1,2, o entre 0,85 y 1,0, y más preferiblemente aproximadamente 0,9. Una relación molar P/Al de al menos 0,5 puede proporcionar un adyuvante con mejores propiedades de envejecimiento.

[0048] El hidroxifosfato de aluminio será generalmente amorfo (es decir, amorfo a los rayos X). Generalmente será particulado (p. ej., morfología similar a una placa como se ve en las micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las placas son de 10-100 nm, y estos forman agregados de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 1-10 μm). Se han informado capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al⁺⁺⁺ a pH 7,4 para adyuvantes de hidroxifosfato de aluminio.

[0049] Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar P/Al entre 0,84 y 0,92, y este adyuvante puede incluirse en 0,6 mg de Al³⁺/ml.

[0050] La concentración de Al⁺⁺⁺ en una composición para administración a un paciente es preferiblemente de menos de 5 mg/ml por ejemplo ≤4 mg/ml, ≤3 mg/ml, ≤2 mg/ml, ≤1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido está entre 0,2 y 1 mg/ml. Se prefiere una concentración máxima de Al⁺⁺⁺ de 0,85 mg/dosis.

5 **[0051]** Al menos el 85% (en peso) de un fHBP en una composición de la invención se adsorbe a hidroxifosfato de aluminio, por ejemplo, ≥90%, ≥95% o incluso 100%. La proporción de fHBP adsorbido puede controlarse alterando la concentración de sal y/o el pH durante la formulación, por ejemplo, en general, una mayor concentración de NaCl puede disminuir la adsorción de fHBP. La cantidad de adsorción para cualquier formulación dependerá de una combinación de parámetros que incluyen el PZC del adyuvante, la concentración de sal y el pH durante la formulación, la concentración de adyuvante, la concentración de antígeno y el pl del antígeno. El impacto de cada uno de estos parámetros en la adsorción se puede evaluar fácilmente. El grado de adsorción puede determinarse comparando la cantidad total de antígeno fHBP en una composición (por ejemplo, medida antes de que ocurra la adsorción, o medida desorbiendo el antígeno adsorbido) con la cantidad que queda en el sobrenadante después de la centrifugación (por ejemplo, vea el capítulo 4 de la ref. 15). La ausencia de antígeno detectable en el sobrenadante después de la centrifugación indica que se ha producido la adsorción total, es decir, todo el fHBP está en el sedimento, que contiene el adyuvante insoluble y su contenido adsorbido.

10 **[0052]** Se conoce el uso de mezclas de diferentes sales de aluminio en una única vacuna por ejemplo, véase la referencia 16. Aunque adyuvantes incluyendo tanto hidroxifosfato de aluminio y el hidróxido se puede utilizar con fHBP, se prefiere que una composición no debe incluir ningún adyuvante de hidróxido de aluminio porque, como se describió anteriormente, puede degradar ciertos antígenos que pueden mezclarse con el fHBP (en particular, sacáridos capsulares bacterianos conjugados).

15 **[0053]** En un primer conjunto de formas de realización, las proteínas fHBP se adsorben de manera eficiente a un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, garantizando que la adsorción se lleva a cabo a un pH que es igual a o por debajo de PZC del adyuvante. Por lo tanto, se puede elegir un adyuvante con un PZC igual o superior a un pH de formulación deseado, o bien se puede elegir un pH igual o inferior a un PZC del adyuvante deseado. El adyuvante y el antígeno se combinan en estas condiciones y se permite la adsorción. El pH no debe ser tan bajo como para evitar la adsorción o desnaturalizar irreversiblemente el fHBP. Así, la adsorción se produce idealmente dentro de 2 unidades de pH (idealmente dentro de 1,2 unidades de pH) del PZC.

20 **[0054]** En un segundo conjunto de realizaciones, las proteínas HBP se adsorben de manera eficiente a un hidroxifosfato de aluminio adyuvante mediante el uso de un antígeno de fHBP meningocócico con un punto isoelectrico entre 5,0 y 7,0 y una lata de aluminio adyuvante de hidroxifosfato con un punto de carga cero también entre 5,0 y 7,0. La adsorción tiene lugar a un pH entre 5,0 y 7,0, y el pH puede mantenerse (antes, durante y/o después de la adsorción) al incluir un tampón para mantener el pH en el rango de 5,0 a 7,0. Dentro del rango de pH de 5,0 y 7,0, un subrango preferido es 5,0 a 6,0. Este segundo enfoque no es adecuado para todos los fHBP ya que algunos (por ejemplo, SEQ ID NO: 20) tienen un pl fuera del rango requerido, pero se puede seleccionar fácilmente un fHBP apropiado.

25 **[0055]** El punto isoelectrico de un fHBP puede determinarse empíricamente mediante una técnica tal como enfoque isoelectrico. Sin embargo, más convenientemente, el punto isoelectrico es un punto isoelectrico teórico. Esto puede calcularse utilizando los valores de pKa de los aminoácidos descritos en la referencia 17, por ejemplo, utilizando la herramienta ExPASy relevante [18]. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos naciente SEQ ID NO: 20 tiene un pl predicho de 7,72 mientras que la SEQ ID NO: 21 y 22 tienen pl predichos de 5,87 y 6,15. Las secuencias maduras SEQ ID NO: 23, 24 y 25 (que comprenden SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente) tienen un pl predicho en el rango relevante: 5,46, 5,72 y 5,86, respectivamente. Una corrección para una amina N-terminal bloqueada (*p. ej.*, cuando está lipidad) reduce el pl en aproximadamente 0,1, pero las SEQ ID NO: 23, 24 y 25 todavía tienen pl pronosticados en el rango de 5,0 a 6,0. Se prefieren las combinaciones donde cada antígeno meningocócico fHBP diferente tiene un pl entre 5,0 y 7,0, y en particular cuando ambos tienen un pl en el rango de 5,0 a 6,0 o en el rango de 5,2 a 6,2.

30 **[0056]** Una combinación útil de antígenos fHBP con Pis en el rango apropiado puede comprender una mezcla de secuencias primera y tercera, basadas en SEQ ID NOs: 4 y 6 (o sus variantes cercanas) o una mezcla de secuencias primera y tercera basadas en una mezcla de SEQ ID NOs: 5 y 6 (o sus variantes cercanas). Detalles adicionales de tales emparejamientos de antígenos se proporcionan anteriormente. Por ejemplo, una combinación de SEQ ID NOs: 23 y 25 es particularmente útil, y estas dos proteínas pueden estar lipidadas (como se discutió anteriormente).

35 **[0057]** En un tercer conjunto de realizaciones, un antígeno de fHBP meningocócico con una pl mayor que un PZC de un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio se puede adsorber de manera eficiente, asegurando que la adsorción se lleva a cabo a un pH dentro de unidades de 1,2 pH del PZC. La adsorción puede tener lugar a un pH superior o inferior al PZC del adyuvante, aunque el pH no debe ser tan extremo como para desnaturalizar irreversiblemente el fHBP. El pH durante la adsorción se consigue preferiblemente incluyendo un tampón que mantiene el pH dentro de 1,2 unidades de pH del PZC del adyuvante. Cuando un pH está dentro de 1,2 unidades de pH, puede estar dentro de 1 unidad de pH o menos, por ejemplo, dentro de unidades de 0,8 pH, dentro de 0,6 unidades de pH, dentro de 0,5 unidades de pH.

65

Orden de mezcla

[0058] La mezcla de antígeno(s) fHBP, hidroxifosfato de aluminio y cualquier tampón puede ocurrir en cualquier orden adecuado, ya sea combinando todos los componentes por separado o mezclando previamente dos componentes y luego mezclando la mezcla previa con el tercer componente.

[0059] Así, por ejemplo, en una realización un procedimiento para preparar una composición inmunogénica puede comprender una etapa de combinar un antígeno de fHBP meningocócico y un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en donde: (i) el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene un punto de carga cero; y (ii) la etapa de combinación se produce a un pH inferior al punto de carga cero de modo que el antígeno fHBP se adsorba al adyuvante.

[0060] En otra realización, un procedimiento para preparar una composición inmunogénica puede comprender una etapa de combinar un antígeno de fHBP meningocócico y un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en donde: (i) el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene un punto de carga cero; y (ii) la composición tiene un pH inferior al punto de carga cero, de modo que el antígeno fHBP se adsorbe al adyuvante.

[0061] En otra realización, un procedimiento para preparar una composición inmunogénica puede comprender etapas de: (i) proporcionar una composición acuosa que comprende un antígeno de fHBP meningocócico y que tiene un pH; (ii) proporcionar un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio que tiene un punto de carga cero que es mayor que dicho pH; y (iii) combinar la composición acuosa con el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio para dar la composición inmunogénica.

[0062] En otra realización, un procedimiento para preparar una composición inmunogénica puede comprender etapas de: (i) proporcionar una composición acuosa que comprende un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio y que tiene un pH, en donde el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene un punto de carga cero que es más alto que dicho pH; y (ii) combinar la composición acuosa con un antígeno meningocócico fHBP para dar la composición inmunogénica.

[0063] En otra realización, un procedimiento para preparar una composición inmunogénica puede comprender etapas de: (i) proporcionar una primera composición acuosa que tiene un pH; (ii) proporcionar una segunda composición acuosa que comprende un antígeno fHBP meningocócico y un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio que tiene un punto de carga cero que es mayor que dicho pH; y (iii) combinar la primera y segunda composiciones acuosas para dar la composición inmunogénica.

[0064] En otra realización, un procedimiento para preparar una composición inmunogénica puede comprender etapas de: (i) proporcionar una primera composición acuosa que tiene un pH; (ii) proporcionar una segunda composición acuosa que comprende un antígeno meningocócico fHBP; y (iii) proporcionar un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio que tiene un punto de carga cero que es mayor que dicho pH; y (iv) combinar en cualquier orden la primera composición acuosa, la segunda composición acuosa y el hidroxifosfato de aluminio, para dar la composición inmunogénica.

[0065] En un método para la adsorción de dos antígenos fHBP meningocócicos diferentes a un hidroxifosfato de aluminio adyuvante, la adsorción de ambos de los antígenos fHBP puede tener lugar a un pH que es igual a o por debajo del aluminio punto de carga cero de hidroxifosfato. Nuevamente, la mezcla de antígenos fHBP, hidroxifosfato de aluminio y un tampón puede ocurrir en cualquier orden adecuado.

[0066] Por lo tanto, en una realización, los dos antígenos diferentes fHBP son adsorbidos por separado a hidroxifosfato de aluminio al pH apropiado, y los dos antígenos adsorbidos a continuación, se pueden mezclar.

[0067] En otra realización, los dos antígenos fHBP diferentes se mezclan entre sí y luego la mezcla se añade a hidroxifosfato de aluminio, en donde el hidroxifosfato de aluminio es o bien a un pH apropiado para la adsorción o donde el pH se ajusta después de la adición de la mezcla.

[0068] En otra realización, se añaden los dos antígenos diferentes fHBP secuencialmente a hidroxifosfato de aluminio, en donde el hidroxifosfato de aluminio es o bien a un pH apropiado para la adsorción o cuando el pH se ajusta después de la adición de uno o ambos antígenos fHBP.

[0069] En otra realización, un antígeno fHBP se mezcla con hidroxifosfato de aluminio y luego se añade el otro antígeno de fHBP a la mezcla, en donde el hidroxifosfato de aluminio es o bien a un pH apropiado para la adsorción antes de la adición del primer antígeno fHBP, o cuando el pH se ajusta después de la adición del primer antígeno fHBP, o cuando el pH se ajusta antes de la adición del segundo antígeno fHBP, o cuando el pH se ajusta después de la adición del segundo antígeno fHBP.

[0070] Estas y otras posibilidades están disponibles para la persona experta para todas las realizaciones de la invención.

Antígeno(s) adicional(es)

[0071] Además de los antígenos fHBP, las composiciones de la invención pueden incluir antígenos adicionales de meningococo o de otros patógenos, por ejemplo, de otras bacterias tales como neumococo.

5 Otros antígenos de polipéptidos meningocócicos

[0072] Además de incluir antígenos meningocócicos polipeptídicos fHBP, una composición puede incluir uno o más otros antígenos polipeptídicos meningocócicos. Por lo tanto, una composición puede incluir un antígeno polipeptídico seleccionado del grupo que consiste en: 287, NadA, NspA, HmbR, NhhA, App y/u Omp85. Estos antígenos estarán presentes de manera útil como polipéptidos purificados, por ejemplo, polipéptidos recombinantes. El antígeno preferiblemente provocará anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto. Si una composición incluye un antígeno PorA, entonces, en algunas realizaciones, solo se incluye un serosubtipo de PorA meningocócico. En algunas realizaciones, no se incluye ninguna proteína de membrana externa de PorA meningocócica en una composición.

[0073] Una composición de la invención puede incluir un antígeno 287. El antígeno 287 se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa de serogrupo B meningocócica MC58 [19] como el gen NMB2132 (número de acceso de GenBank GI: 7227388; SEQ ID NO: 9 en este documento). Las secuencias del antígeno 287 de muchas cepas se han publicado desde entonces. Por ejemplo, las formas alélicas de 287 se pueden ver en las Figuras 5 y 15 de la referencia 20, y en el ejemplo 13 y la figura 21 de la referencia 21 (SEQ IDS 3179 a 3184). También se han informado varios fragmentos inmunogénicos del antígeno 287. Los 287 antígenos preferidos para usar con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad del 50% o más (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más) a la SEQ ID NO: 9; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 9, en donde 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de SEQ ID NO: 9. Los 287 antígenos más útiles de la invención pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9. Los 287 antígenos ventajosos para uso con la invención pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

[0074] Una composición de la invención puede incluir un antígeno de NadA. El antígeno NadA se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa del serogrupo B meningocócica MC58 [19] como el gen NMB1994 (número de acceso de GenBank GI: 7227256; SEQ ID NO: 10 en este documento). Las secuencias del antígeno NadA de muchas cepas se han publicado desde entonces, y la actividad de la proteína como una adhesina de Neisseria ha sido bien documentada. También se han informado varios fragmentos inmunogénicos de NadA. Los antígenos NadA preferidos para uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad del 50% o más (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más) a la SEQ ID NO: 10; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 10, en donde 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de SEQ ID NO: 10. Los antígenos NadA más útiles de la invención pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10. Los antígenos NadA ventajosos para uso con la invención pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto. SEQ ID NO: 6 es uno de esos fragmentos.

[0075] Una composición de la invención puede incluir un antígeno NspA. El antígeno NspA se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa de serogrupo B meningocócica MC58 [19] como el gen NMB0663 (número de acceso de GenBank GI: 7225888; SEQ ID NO: 11 en este documento). El antígeno se conocía previamente por las referencias 22 y 23. Las secuencias del antígeno NspA de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han informado varios fragmentos inmunogénicos de NspA. Los antígenos NspA preferidos para uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más) a la SEQ ID NO: 11; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 11, en donde 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de SEQ ID NO: 11. Los antígenos NspA más útiles de la invención pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11. Los antígenos ventajosos de NspA para uso con la invención pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

[0076] Las composiciones de la invención pueden incluir un antígeno RMH meningocócico. La secuencia HmbR de longitud completa se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa del serogrupo B meningocócica MC58 [19] como el gen NMB1668 (SEQ ID NO: 7 en este documento). La referencia 24 informa una secuencia HmbR de una cepa diferente (SEQ ID NO: 8 en este documento). SEQ ID NO: 7 y 8 difieren en longitud por 1 aminoácido y tienen una identidad del 94,2%. La invención puede usar un polipéptido que comprende una secuencia HmbR de longitud completa, pero a menudo usará un polipéptido que comprende una secuencia HmbR parcial. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una secuencia HmbR usada según la invención puede comprender una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos un % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, donde el valor de i es 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o más. En otras realizaciones, una secuencia HmbR usada de acuerdo con la invención puede comprender un fragmento de al menos j aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 7, donde el valor de j es 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más. En otras realizaciones, una secuencia HmbR usada según la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos un i % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 y/o (ii) que comprende un fragmento de al menos j aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 7. Los fragmentos preferidos de j aminoácidos comprenden un epítipo de SEQ ID NO: 7. Tales epítipos generalmente comprenderán aminoácidos que se encuentran en la superficie de HmbR. Los epítipos útiles incluyen aquellos con aminoácidos involucrados en la unión de HmbR a la hemoglobina, ya que los anticuerpos que se unen a estos epítipos pueden bloquear la capacidad de una bacteria para unirse a la hemoglobina del huésped. La topología de HmbR, y sus residuos funcionales críticos, se investigaron en la referencia 25. Los antígenos HmbR más útiles de la invención pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7. Los antígenos HmbR ventajosos para uso con la invención pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

[0077] Una composición de la invención puede incluir un antígeno NhhA. El antígeno NhhA se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa de serogrupo B meningocócica MC58 [19] como el gen NMB0992 (número de acceso de GenBank GI: 7226232; SEQ ID NO: 12 en este documento). Las secuencias del antígeno NhhA de muchas cepas se han publicado desde, *p.ej.* referencias 20 y 26, y se han informado varios fragmentos inmunogénicos de NhhA. También se conoce como Hsf. Los antígenos NhhA preferidos para usar con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más) a la SEQ ID NO: 12; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 12, en donde 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de SEQ ID NO: 12. Los antígenos NhhA más útiles de la invención pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12. Los antígenos NhhA ventajosos para usar con la invención pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

[0078] Una composición de la invención puede incluir un antígeno App. El antígeno App se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 de serogrupo B meningocócica [19] como el gen NMB1985 (número de acceso de GenBank GI: 7227246; SEQ ID NO: 13 en este documento). Las secuencias del antígeno App de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han informado varios fragmentos inmunogénicos de la aplicación. Los antígenos App preferidos para usar con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad del 50% o más (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más) a la SEQ ID NO: 13; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 13, en donde 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de SEQ ID NO: 13. Los antígenos App más útiles de la invención pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13. Los antígenos de aplicación ventajosos para uso con la invención pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

[0079] Una composición de la invención puede incluir un antígeno de Omp85. El antígeno Omp85 se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa del serogrupo B meningocócica MC58 [19] como el gen NMB0182 (número de acceso de GenBank GI: 7225401; SEQ ID NO: 14 en este documento). Las secuencias del antígeno Omp85 de muchas cepas se han publicado desde entonces. Se puede encontrar más información sobre Omp85 en las referencias 27 y 28. También se han informado varios fragmentos inmunogénicos de Omp85. Los antígenos Omp85 preferidos para usar con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad del 50% o más (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más) a la SEQ ID NO: 14; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 14, en donde 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de SEQ ID NO: 14. Los antígenos Omp85 más útiles de la invención pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14. Los antígenos Omp85 ventajosos para uso con la invención pueden provocar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

Lipooligosacárido meningocócica

[0080] Además de incluir antígenos meningocócicos polipeptídicos fHBP, una composición puede incluir uno o más antígeno(s) lipooligosacáridos meningocócicos (LOS). La LOS meningocócica es un fosfolípido a base de glucosamina que se encuentra en la monocapa externa de la membrana externa de la bacteria. Incluye una porción de lípido A y una región central de oligosacáridos, actuando la porción de lípido A como un ancla hidrofóbica en la membrana. La heterogeneidad dentro del núcleo del oligosacárido genera diversidad estructural y antigénica entre diferentes cepas

meningocócicas, que se ha utilizado para subdividir las cepas en 12 inmunotipos (L1 a L12). La invención puede usar LOS de cualquier inmunotipo, *p.ej* de L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 y/o L8.

5 [0081] Las cadenas α de L2 y L3 incluyen, naturalmente, lacto-N-neotetraosa (LNnT). Cuando la invención usa LOS de un inmunotipo L2 o L3, este LNnT puede estar ausente. Esta ausencia se puede lograr convenientemente mediante el uso de cepas mutantes diseñadas para alterar su capacidad de sintetizar el tetrasacárido LNnT dentro de la cadena α . Se sabe que logra esta diana mediante la eliminación de las enzimas que son responsables de las adiciones biosintéticas relevantes [29, 30]. Por ejemplo, la eliminación de la enzima LgtB evita la adición de la galactosa terminal de LNnT, así como también evita la adición corriente abajo del ácido siálico terminal de la cadena α . La eliminación de la enzima LgtA impide la adición de la N-acetilglucosamina de LNnT, y también las adiciones posteriores. La eliminación de LgtA puede estar acompañada por la eliminación de LgtC. De manera similar, la eliminación de la enzima LgtE y/o GalE impide la adición de galactosa interna, y la eliminación de LgtF evita la adición de glucosa al residuo de Hep^I. Cualquiera de estos knockouts puede usarse, individualmente o en combinación, para alterar el tetrasacárido LNnT en una cepa de inmunotipo L2, L3, L4, L7 o L9. Se prefiere la eliminación de al menos LgtB, ya que proporciona un LOS que retiene la inmunogenicidad útil mientras se elimina el epítipo LNnT.

10 [0082] Además de, o en lugar de, las mutaciones de interrumpir el epítipo LNnT, un knockout del gen *galE* también proporciona un útil LOS modificado, y un gen de transferasa graso de lípido A puede similarmente ser eliminado [31]. Al menos un ácido graso O-enlazado primario se puede eliminar de LOS [32]. También se puede usar LOS que tiene un número reducido de cadenas de acilo secundarias por molécula de LOS [33]. El LOS típicamente incluirá al menos la fosfoetanolamina GlcNAc-Hep₂ al menos una estructura de lípido A KDO₂ [34]. El LOS puede incluir un trisacárido GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc mientras carece del tetrasacárido LNnT.

15 [0083] LOS se pueden incluir en composiciones de la invención en diversas formas. Se puede usar en forma purificada por sí solo. Se puede conjugar con una proteína transportadora. Cuando LOS se conjuga, la conjugación puede ser a través de una porción de lípido A en el LOS o por cualquier otro resto adecuado, por ejemplo, sus restos KDO. Si el resto lípido A de LOS está ausente, entonces se requiere dicha unión alternativa. Las técnicas de conjugación para LOS se conocen, por ejemplo, por las referencias 32, 34, 35, 36, *etc.* Las proteínas transportadoras útiles para estos conjugados se analizan a continuación, por ejemplo, toxinas bacterianas, tales como toxinas de difteria o tétanos, o toxoides o mutantes de las mismas.

20 [0084] El LOS puede ser de una cepa (por ejemplo, una cepa meningocócica modificada genéticamente) que tiene un inmunotipo LOS fijo (es decir, no variable de fase) como se describe en la referencia 37. Por ejemplo, los inmunotipos LOS L2 y L3 pueden ser fijos. Dichas cepas pueden tener una tasa de cambio entre inmunotipos que se reduce en más de 2 veces (incluso >50 veces) en relación con la cepa original de tipo salvaje. La referencia 37 describe cómo este resultado se puede lograr mediante modificación de los productos génicos *lgtA* y/o *lgtG*.

25 [0085] LOS puede ser O-acetilado en un GlcNac residuo unido a su Heptosa II residuo por ejemplo, para L3 [38].

30 [0086] Una composición inmunogénica puede incluir más de un tipo de LOS por ejemplo LOS de inmunotipos meningocócicos L2 y L3. Por ejemplo, se pueden usar las combinaciones LOS descritas en la referencia 39.

35 [0087] El antígeno A LOS puede preferiblemente elicitar anticuerpos anti-meningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

40 [0088] Sin embargo, las composiciones preferidas de la invención están libres de lipooligosacárido meningocócico.

Antígeno(s) de sacárido capsular meningocócico

45 [0089] Además de incluir antígenos meningocócicos polipeptídicos fHBP, una composición puede incluir uno o más conjugados de sacáridos capsulares meningocócicos. Una composición de la invención puede incluir uno o más conjugados de sacáridos capsulares de 1, 2, 3 o 4 de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, por ejemplo, A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, A+W135+Y, A+C+W135+Y, *etc.* Son útiles las composiciones que incluyen un conjugado de sacárido capsular serogrupo C, y son ideales las composiciones que incluyen los sacáridos de los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y.

50 [0090] El sacárido capsular del serogrupo A de meningococo es un homopolímero de N-acetilo-D-manosamina-1-fosfato enlazado a (α 1 \rightarrow 6), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La acetilación en la posición C-3 puede ser del 70-95%. Las condiciones utilizadas para purificar el sacárido pueden dar como resultado la desacetilación de O (por ejemplo, en condiciones básicas), pero es útil retener OAc en esta posición C-3. En algunas realizaciones, al menos el 50% (por ejemplo, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de los residuos de manosamina en un sacárido del serogrupo A están O-acetilados en la posición C-3. Los grupos acetilo se pueden reemplazar con grupos de bloqueo para evitar la hidrólisis [40], y dichos sacáridos modificados siguen siendo sacáridos del serogrupo A en el sentido de la invención.

55 [0091] El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico enlazado a (α 2 \rightarrow 9) (ácido

neuramínico de *N*-acetilo, o 'NeuNAc'). La estructura del sacárido se escribe como $\rightarrow 9$ -Neu p NAc 7/8 OAc-($\alpha 2 \rightarrow$). La mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los residuos de ácido siálico, pero alrededor del 15% de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [41,42]. La presencia o ausencia de grupos OAc genera epítomos únicos, y la especificidad de la unión de anticuerpos al sacárido puede afectar su actividad bactericida contra (OAc+) O-acetilado y cepas O-acetiladas (OAc-) [43-45]. Los sacáridos del serogrupo C usados con la invención pueden prepararse a partir de cepas OAc+ u OAc-. Las vacunas conjugadas MenC autorizadas incluyen sacáridos OAc-(NEISVAC-C™) y OAc+ (MENJUGATE™ y MENINGITEC™). En algunas realizaciones, las cepas para la producción de conjugados de serogrupo C son cepas OAc+, por ejemplo, del serotipo 16, serosubtipo P1.7a, 1, etc. Por lo tanto, las cepas OAc+ de C:16:P1.7a,1 pueden ser utilizadas. Las cepas OAc+ en serosubtipo P1.1 son también útiles, tales como la cepa C11.

[0092] El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de disacárido de ácido siálico-galactosa. Al igual que el sacárido C del serogrupo, tiene una O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [46]. La estructura se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow).

[0093] El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido de serogrupo W135, excepto que la unidad de repetición de disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa. Al igual que el serogrupo W135, tiene una O-acetilación variable en las posiciones de ácido siálico 7 y 9 [46]. La estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Glc- α -(1 \rightarrow).

[0094] Los sacáridos utilizados según la invención pueden ser O-acetilados como se describe anteriormente (por ejemplo, con el mismo patrón de O-acetilación como se ve en los sacáridos capsulares nativos), o pueden estar parcial o totalmente desacetilados en una o más posiciones de los anillos sacáridos, o pueden estar hiperacetilados en relación con los sacáridos capsulares nativos.

[0095] Los restos de sacáridos en los conjugados pueden comprender sacáridos de longitud completa como se ha preparado a partir de los meningococos, y/o puede comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa, es decir, los sacáridos pueden ser más cortos que los sacáridos nativos capsulares vistos en las bacterias. De este modo, los sacáridos pueden despolimerizarse, produciéndose la despolimerización durante o después de la purificación de sacárido, pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos. Un método de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (por ejemplo, para dar una concentración final de H₂O₂ al 1%), y luego se incuba la mezcla (por ejemplo a aproximadamente 55°C) hasta lograrse una reducción de la longitud de cadena deseada. Otro método de despolimerización implica la hidrólisis ácida. Otros métodos de despolimerización son conocidos en la técnica. Los sacáridos utilizados para preparar conjugados para su uso según la invención pueden obtenerse mediante cualquiera de estos métodos de despolimerización. La despolimerización puede usarse para proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de la cadena para la capacidad de administración física de los sacáridos. En algunas realizaciones, los sacáridos tienen el siguiente rango de grados promedio de polimerización (Dp): A=10-20; C=12-22; W135=15-25; Y=15-25. En términos de peso molecular, en lugar de Dp, los rangos útiles son, para todos los serogrupos: <100kDa; 5kDa-75kDa; 7kDa-50kDa; 8kDa-35kDa; 12kDa-25kDa; 15kDa-22kDa.

[0096] En algunas realizaciones, el peso molecular promedio para sacáridos de cada uno de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y puede ser más que 50 kDa por ejemplo ≥ 75 kDa, ≥ 100 kDa, ≥ 110 kDa, ≥ 120 kDa, ≥ 130 kDa, etc. [47], e incluso hasta 1500kDa, en particular según lo determinado por MALLS. Por ejemplo: un sacárido MenA puede estar en el rango de 50-500 kDa, p.ej. 60-80kDa; un sacárido MenC puede estar en el rango de 100-210 kDa; un sacárido MenW135 puede estar en el rango de 60-190kDa, por ejemplo, 120-140kDa; y/o un sacárido MenY puede estar en el rango de 60-190kDa, por ejemplo, 150-160kDa.

[0097] La masa de sacárido meningocócico por serogrupo en una composición por lo general será entre 1 μ g y 20 μ g, por ejemplo, entre 2 y 10 μ g por serogrupo, o aproximadamente 4 μ g o aproximadamente 5 μ g o aproximadamente 10 μ g. Cuando se incluyen conjugados de más de un serogrupo, entonces pueden estar presentes en masas sustancialmente iguales, por ejemplo, la masa del sacárido de cada serogrupo está dentro de +10% entre sí. Como alternativa a una proporción igual, se puede usar una masa doble de sacárido del serogrupo A. Así, una vacuna puede incluir sacárido MenA a 10 μ g y sacáridos MenC, W135 e Y a 5 μ g cada uno.

[0098] Proteínas portadoras útiles para conjugados meningocócicos incluyen toxinas bacterianas, tales como toxinas de difteria o tétanos o toxoides o mutantes de los mismos. Estos se usan comúnmente en vacunas conjugadas. Por ejemplo, el mutante de la toxina de la difteria CRM197 es útil [48]. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen péptidos sintéticos [49,50], proteínas de choque térmico [51,52], proteínas de tos ferina [53,54], citocinas [55], linfoquinas [55], hormonas [55], factores de crecimiento [55], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4⁺ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [56] como N19 [57], proteína D de *H. influenzae* [58-60], neumolisina [61] o sus derivados no tóxicos [62], proteína de superficie neumocócica PspA [63], proteínas de absorción de hierro [64], toxina A o B de *C. difficile* [65], exoproteína recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* A (rEPA) [66], etc. Se prefiere CRM197.

[0099] Cuando una composición incluye conjugados de más de un serogrupo meningocócico, es posible el uso de la misma proteína portadora para cada conjugado separado, o para usar diferentes proteínas portadoras. Sin embargo, en ambos casos, se formará una mezcla de diferentes conjugados preparando cada conjugado de serotipo por separado y luego mezclándolos para formar una mezcla de conjugados separados.

[0100] Los conjugados con una relación de sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido) se pueden utilizar por ejemplo las proporciones entre 1:2 y 5:1 y las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Como se describe en la referencia 67, diferentes conjugados de serogrupo meningocócico en una mezcla pueden tener diferentes relaciones sacárido:proteína, por ejemplo, uno puede tener una relación de entre 1:2 y 1:5, mientras que otro tiene una relación entre 5:1 y 1:1.99.

[0101] Una proteína transportadora se puede conjugar covalentemente a un sacárido meningocócico directamente o mediante un conector. Se conocen varios enlazadores. Por ejemplo, la unión puede ser a través de un carbonilo, que puede formarse por reacción de un grupo hidroxilo libre de un sacárido modificado con CDI [68,69] seguido de reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Se puede usar la condensación de carbodiimida [70]. Un conector de ácido adípico se puede utilizar, que puede estar formado por acoplamiento de un grupo libre -NH₂ (por ejemplo, introducido a un sacárido por aminación) con ácido adípico (usando, por ejemplo, la activación de diimida), y luego el acoplamiento de una proteína al intermedio resultante sacárido-ácido adípico [71,72]. Otros enlazadores incluyen β-propionamido [73], nitrofenilo-etilamina [74], haluros de haloacilo [75], enlaces glucosídicos [76], ácido 6-aminocaproico [77], N-succinimidilo-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [78], dihidrazida de ácido adípico ADH [79], restos C₄ a C₁₂ [80], etc.

[0102] La conjugación mediante aminación reductora se puede utilizar. El sacárido se puede oxidar primero con peryodato para introducir un grupo aldehído, que luego puede formar un enlace covalente directo a una proteína transportadora mediante aminación reductora, p. ej. al grupo ε-amino de una lisina. Si el sacárido incluye múltiples grupos aldehído por molécula, entonces esta técnica de enlace puede conducir a un producto reticulado, donde múltiples aldehídos reaccionan con múltiples aminas transportadoras.

[0103] Como se describe en la referencia 81, una mezcla puede incluir un conjugado con enlace sacárido/proteína directo y otro conjugado con enlace a través de un conector. Esta disposición se aplica particularmente cuando se usan conjugados de sacárido de diferentes serogrupos meningocócicos, por ejemplo, los sacáridos MenA y MenC se pueden conjugar a través de un conector, mientras que los sacáridos MenW135 y MenY se pueden conjugar directamente a una proteína transportadora.

[0104] Un sacárido meningocócico puede comprender un sacárido intacto de longitud completa preparado a partir de meningococo, y/o puede comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa, es decir, los sacáridos pueden ser más cortos que los sacáridos capsulares nativos vistos en bacterias. De este modo, los sacáridos pueden despolimerizarse, produciéndose la despolimerización durante o después de la purificación de sacárido, pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos. La despolimerización puede usarse para proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de la cadena para la capacidad de administración física de los sacáridos.

Sacárido(s) capsulares neumocócicos conjugados

[0105] Las composiciones de la invención pueden incluir un sacárido capsular neumocócico conjugado con una proteína transportadora.

[0106] La invención puede incluir sacárido capsular de uno o más serotipos neumocócicos diferentes. Cuando una composición incluye antígenos sacáridos de más de un serotipo, estos se preparan preferiblemente por separado, se conjugan por separado y luego se combinan. Los métodos para purificar sacáridos capsulares neumocócicos son conocidos en la técnica (por ejemplo, véase la referencia 82) y las vacunas basadas en sacáridos purificados de 23 serotipos diferentes se conocen desde hace muchos años. También se han descrito mejoras en estos métodos, por ejemplo, para el serotipo 3 como se describe en la referencia 83, o para los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F y 19A como se describe en la referencia 84.

[0107] Sacárido(s) capsulares neumocócicos típicamente serán seleccionados de los siguientes serotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y/o 33F. Así, en total, una composición puede incluir un sacárido capsular de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más serotipos diferentes.

[0108] Una combinación útil de serotipos es una combinación de 7 valentes, por ejemplo, que incluye sacárido capsular de cada uno de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Otra combinación útil es una combinación de 9 valentes, por ejemplo, que incluye sacárido capsular de cada uno de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Otra combinación útil es una combinación de 10 valentes, por ejemplo, incluyendo sacárido capsular de cada uno de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una combinación de 11 valentes puede incluir además sacárido del serotipo 3. Una combinación de 12 valentes puede agregarse a la mezcla de 10 valentes: serotipos 6A y 19A; 6A y

22F; 19A y 22F; 6A y 15B; 19A y 15B; o 22F y 15B. Una combinación de 13 valentes puede agregarse a la mezcla de 11 valentes: serotipos 19A y 22F; 8 y 12F; 8 y 15B; 8 y 19A; 8 y 22F; 12F y 15B; 12F y 19A; 12F y 22F; 15B y 19A; 15B y 22F; 6A y 19A, etc.

5 **[0109]** Por lo tanto, una combinación útil de 13 valentes incluye sacárido capsular de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19, 19F y 23F, por ejemplo, preparado como se describe en las referencias 85 a 88. Una de estas combinaciones incluye el sacárido del serotipo 6B a aproximadamente 8 µg/ml y los otros 12 sacáridos a concentraciones de aproximadamente 4 µg/ml cada uno. Otra combinación de este tipo incluye los sacáridos del serotipo 6A y 6B a aproximadamente 8 µg/ml cada uno y los otros 11 sacáridos a aproximadamente 4 µg/ml cada uno.

10 **[0110]** Proteínas de soporte adecuadas para los conjugados se discuten anteriormente en relación con conjugados meningocócicos. Las proteínas transportadoras particularmente útiles para las vacunas conjugadas neumocócicas son CRM197, toxoide tetánico, toxoide diftérico y proteína D. *H. influenzae* D. CRM197 se usa en PREVNAR™. Una mezcla de 13 valentes puede usar CRM197 como la proteína transportadora para cada uno de los 13 conjugados, y CRM197 puede estar presente a aproximadamente 55-60 µg/ml.

15 **[0111]** Cuando una composición incluye conjugados de más de un serotipo neumocócico, es posible usar la misma proteína transportadora para cada conjugado separado, o usar diferentes proteínas transportadoras. Sin embargo, en ambos casos, se formará una mezcla de diferentes conjugados preparando cada conjugado de serotipo por separado y luego mezclándolos para formar una mezcla de conjugados separados. La referencia 89 describe las ventajas potenciales cuando se utilizan diferentes proteínas transportadoras en vacunas conjugadas neumocócicas multivalentes, pero el producto PREVNAR™ utiliza con éxito el mismo vehículo para cada uno de los siete serotipos diferentes.

20 **[0112]** Una proteína transportadora se puede conjugar covalentemente a un sacárido neumocócico directamente o mediante un conector, como se discutió anteriormente en relación con los conjugados meningocócicos. Las técnicas de conjugación de reticulación son particularmente útiles para al menos los serotipos neumocócicos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

25 **[0113]** Como se discutió anteriormente para los sacáridos meningocócicos, un sacárido neumocócico puede comprender un sacárido de longitud completa intacto como preparado a partir de neumococo, y/o puede comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa. Cuando se usa más de un serotipo neumocócico, entonces es posible usar sacáridos intactos para cada serotipo, fragmentos para cada serotipo, o usar sacáridos intactos para algunos serotipos y fragmentos para otros serotipos. Cuando una composición incluye sacárido de cualquiera de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 19F y 23F, estos sacáridos están preferiblemente intactos. Por el contrario, cuando una composición incluye sacárido serotipo 18C, preferiblemente se despolimeriza.

30 **[0114]** Un serotipo 3 sacárido también puede ser despolimerizado, por ejemplo, un sacárido serotipo 3 se puede someter a hidrólisis ácida para la despolimerización [85] por ejemplo, usando ácido acético. Los fragmentos resultantes pueden entonces ser oxidados para la activación (por ejemplo, peryodato de oxidación, tal vez en la presencia de cationes bivalentes, por ejemplo, con MgCl₂), conjugado a un portador (por ejemplo CRM197) en condiciones reductoras (por ejemplo, usando cianoborohidruro de sodio) y, a continuación (opcionalmente) cualquier aldehído no reaccionado en el sacárido puede ser tapado (por ejemplo, usando borohidruro de sodio) [85]. La conjugación se puede realizar sobre material liofilizado, por ejemplo, después de sacar y sacar el sacárido activado conjuntamente.

35 **[0115]** Un sacárido de serotipo 1 puede ser al menos parcialmente desacetilado, por ejemplo, logrado mediante un tratamiento de tampón de pH alcalino [86] tal como usando un tampón de bicarbonato/carbonato. Tales sacáridos (parcialmente) des-O-acetilados pueden oxidarse para su activación (por ejemplo, oxidación de peryodato), conjugarse con un vehículo (por ejemplo, CRM197) en condiciones reductoras (por ejemplo, usar cianoborohidruro de sodio) y luego (opcionalmente) cualquier aldehído sin reaccionar en el sacárido puede ser tapado (por ejemplo, usando borohidruro de sodio) [86]. La conjugación puede realizarse en material de liofilizado por ejemplo después de sacárido activado de co-liofilización y el portador.

40 **[0116]** Un sacárido de serotipo 19A puede estar oxidado para la activación (por ejemplo, peryodato de oxidación), conjugado a un portador (por ejemplo CRM197) en DMSO bajo condiciones de reducción y, a continuación (opcionalmente) cualquier aldehído sin reaccionar en el sacárido puede ser un tope (por ejemplo, usando sodio borohidruro) [90]. La conjugación se puede realizar sobre material liofilizado, por ejemplo, después de colifolizar el sacárido activado y el portador. Los conjugados neumocócicos pueden provocar idealmente anticuerpos anticapsulares que se unen al sacárido relevante, por ejemplo, provocar un nivel de anticuerpo antisacárido ≥0,20 µg/ml [91]. Los anticuerpos pueden evaluarse mediante inmunoensayo enzimático (EIA) y/o medición de la actividad opsonofagocítica (OPA). El método EIA ha sido ampliamente validado y existe un vínculo entre la concentración de anticuerpos y la eficacia de la vacuna.

45 Antígenos adicionales de otro(s) patógeno(s)

60 **[0117]** Las composiciones de la invención pueden incluir antígeno(s) de otro(s) patógeno(s). El uso de un adyuvante

de hidroxifosfato de aluminio, y la evitación de un adyuvante de hidróxido de aluminio, es ventajoso en el contexto de tales combinaciones porque, como se describió anteriormente, los antígenos adicionales (en particular los sacáridos capsulares bacterianos) pueden ser sensibles a la sal de hidróxido.

5 **[0118]** Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como el antígeno de superficie HBsAg.
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B.pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.
- 10 - un antígeno de difteria, como un toxoide diftérico.
- un antígeno tetánico, como un toxoide tetánico.
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B (Hib), típicamente conjugado.
- antígeno(s) de poliovirus inactivado(s).

15 **[0119]** Cuando se incluye un antígeno de difteria en la composición, también se prefiere incluir antígenos de tétanos y antígenos de tos ferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno tetánico, se prefiere también incluir antígenos de difteria y tos ferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de tos ferina, se prefiere también incluir antígenos de difteria y tétanos. Por lo tanto, se prefieren las combinaciones DTP.

20 Preparación extemporánea

[0120] También divulgamos un kit que comprende: (i) un primer componente que comprende al menos un antígeno fHBP adsorbido a un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, como se describió anteriormente; y (ii) un segundo componente que comprende un inmunógeno no meningocócico. Los componentes del kit se pueden mezclar para dar una composición inmunogénica para administrar a un paciente para proteger contra múltiples patógenos.

[0121] También divulgamos un método para preparar una vacuna combinada, que comprende una etapa de mezcla: (i) un primer componente que comprende al menos un antígeno fHBP adsorbido en un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, como se describió anteriormente; y (ii) un segundo componente que comprende un inmunógeno no meningocócico. El material mezclado puede administrarse luego a un paciente. El segundo componente puede liofilizarse, de modo que un primer componente acuoso lo reconstituya.

Composiciones farmacéuticas

35 **[0122]** La invención se refiere a composiciones inmunogénicas para administración a un paciente. Estas composiciones son farmacéuticamente aceptables y típicamente incluirán un vehículo adecuado. Una discusión exhaustiva de los portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 92.

40 **[0123]** Volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición tiene un volumen de aproximadamente 0,5 ml.

45 **[0124]** El pH de una composición de la invención es por lo general entre 6 y 8, y más preferiblemente entre 6,5 y 7,5 (por ejemplo aproximadamente 7). Como ya se discutió anteriormente, las composiciones pueden incluir un tampón, por ejemplo, un tampón Tris, un tampón citrato, tampón fosfato, un tampón succinato (tal como un tampón succinato sódico) o un tampón histidina.

50 **[0125]** Se puede usar un pH particular antes y/o durante la adsorción, como se explicó anteriormente. Sin embargo, si la adsorción es estable, ese pH no tiene que mantenerse después de la adsorción, pero se puede permitir que aumente, por ejemplo, más cerca de neutral. Después de la adsorción, por lo tanto, dicha composición puede ser tamponada a un pH por encima del PZC del adyuvante.

55 **[0126]** El pH de una composición puede estar en el rango de 5,0 a 7,0 antes y/o durante la adsorción, pero puede estar fuera de este rango (por ejemplo, en el rango de 7,0 a 8,0) después de la adsorción. Sin embargo, idealmente, tales composiciones se mantienen con un pH posterior a la adsorción en el intervalo de 5,0 a 7,0 mediante el uso de un tampón.

60 **[0127]** Si la adsorción ha tenido lugar a un pH por encima del PZC del adyuvante, entonces, si la adsorción es estable, no es necesario mantener el pH, pero puede dejarse caer, por ejemplo, más cerca de neutral. Después de la adsorción, por lo tanto, dicha composición puede ser tamponada a un pH por debajo del PZC del adyuvante.

[0128] El pH de una composición puede estar dentro de 1,2 unidades de pH del PZC del adyuvante antes y/o durante la adsorción, pero puede estar fuera de este intervalo después de la adsorción. Sin embargo, idealmente, tales composiciones se mantienen con un pH posterior a la adsorción dentro de 1,2 unidades de pH del PZC del adyuvante.

65 **[0129]** En algunas realizaciones, una composición de la invención incluye un tampón con un pKa entre 3,5 y 6,5, particularmente cuando se usa en combinación con solución salina. Se dice que esta formulación es útil con fHBP en

la referencia 93. Un tampón de succinato con 1-10 mM de succinato (por ejemplo, 5 mM) es útil, con un pH entre 5,8 y 6,0. La composición puede incluir MgCl₂, KCl y/o NaCl.

5 [0130] La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los humanos.

[0131] Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo cloruro sódico) para dar tonicidad. Una concentración de 10±2 mg/ml de NaCl es típica, por ejemplo, aproximadamente 9 mg/ml.

10 [0132] Las composiciones de la invención para la administración a los pacientes son inmunogénicas, y son más preferiblemente de vacunas composiciones. Las vacunas según la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir infecciones) o terapéuticas (es decir, para tratar infecciones), pero típicamente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de antígeno(s), así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente efectiva" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía según la salud y la condición física del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primates no humanos, primates, *etc.*), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante sobre la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un rango relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos de rutina. El contenido de antígeno de las composiciones de la invención generalmente se expresará en términos de la cantidad de proteína por dosis.

25 [0133] Los meningococos afectan a diversas áreas del cuerpo y por lo tanto las composiciones de la invención se pueden preparar en diversas formas líquidas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, como soluciones o suspensiones. La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, mediante un inhalador, usando un aerosol fino. La composición puede prepararse para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como pulverización o gotas. Los inyectables para administración intramuscular son los más típicos.

30 [0134] Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, en particular cuando se envasa en formato de múltiples dosis. Los antimicrobianos como el tiomersal y el 2-fenoxietanol se encuentran comúnmente en las vacunas, pero se prefiere usar un conservante sin mercurio o ningún conservante.

35 [0135] Las composiciones de la invención pueden comprender detergente, por ejemplo un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes están generalmente presentes a bajos niveles por ejemplo, <0,01%, pero los niveles más altos se han sugerido para la estabilización de formulaciones de antígeno [93] por ejemplo, hasta 10% Una composición de ejemplo puede incluir de 0,01 a 0,05% de polisorbato, y esto es particularmente útil cuando se usan antígeno(s) de fHBP lipidado.

40

Métodos de tratamiento

45 [0136] Las composiciones de la invención pueden usarse en un método para elevar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar una composición de la invención al mamífero. La respuesta inmune es preferiblemente protectora contra el meningococo y preferiblemente involucra anticuerpos. El método puede generar una respuesta de refuerzo en un paciente que ya ha sido preparado.

50 [0137] El mamífero es preferiblemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferiblemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un bebé) o un adolescente; donde la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferiblemente un adulto. Una vacuna destinada a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, *etc.*

55 [0138] Las composiciones de la invención se describen para su uso como medicamento. El medicamento se utiliza preferiblemente, como se ha descrito anteriormente, para elevar una respuesta inmune en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferiblemente una vacuna.

[0139] También divulgamos el uso de al menos un antígeno fHBP y un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio en la fabricación de un medicamento para aumentar la respuesta inmune, como se describió anteriormente, en un mamífero.

60 [0140] Estos usos y métodos son preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por *N. meningitidis*, por ejemplo, meningitis bacteriana (o, más específicamente, meningocócica) o septicemia.

65 [0141] Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar la infección meningocócica después de la administración de la composición de la invención. Una forma de verificar la eficacia del tratamiento profiláctico consiste en controlar las respuestas inmunes contra los antígenos después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse administrándolas a

sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12 a 16 meses de edad o modelos animales) y luego determinando parámetros estándar que incluyen anticuerpos bactericidas en suero (SBA) y títulos ELISA (GMT) para meningococo. Estas respuestas inmunes generalmente se determinarán alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un aumento de SBA de al menos 4 veces u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, se puede hacer más de una determinación posterior a la administración.

[0142] Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. La entrega directa se puede lograr mediante inyección parenteral (p. ej. subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente o al espacio intersticial de un tejido), o por cualquier otra vía adecuada. La invención puede usarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero la inyección sin aguja puede usarse alternativamente. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

[0143] El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. Se pueden usar dosis múltiples en un programa de vacunación primaria y/o en un programa de vacunación de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede ser seguido por un programa de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis de cebado (p. ej., entre 4 y 16 semanas), y entre el cebado y el refuerzo, se puede determinar de forma rutinaria.

General

[0144] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, las referencias 94-100, etc.

[0145] El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ejemplo X + Y.

[0146] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

[0147] Cuando la invención se refiere a un "epítipo", este epítipo puede ser un epítipo de células B y/o un epítipo de células T, pero normalmente será un epítipo de células B. Dichos epítipos pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, utilizando PEPSCAN [101,102] o métodos similares), o pueden predecirse (por ejemplo, utilizando el índice antigénico de Jameson-Wolf [103], enfoques basados en matriz [104], MAPITOPE [105], TEPITOPE [106,107], las redes neuronales [108], optimero y epímero [109,110], ADEPT [111], TSITES [112], la hidrofiliencia [113], índice antigénico [114] o los métodos descritos en las referencias 115-119, etc.). Los epítipos son las partes de un antígeno que se reconocen y se unen a los sitios de unión al antígeno de los anticuerpos o receptores de células T, y también pueden denominarse "determinantes antigénicos".

[0148] Cuando la invención usa un antígeno "purificado", este antígeno se separa de su entorno natural. Por ejemplo, el antígeno estará sustancialmente libre de otros componentes meningocócicos, distintos de cualquier otro antígeno purificado que esté presente. Típicamente, se preparará una mezcla de antígenos purificados purificando cada antígeno por separado y luego volviéndolos a combinar, incluso si los dos antígenos están naturalmente presentes en la mezcla.

[0149] Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando alineado, ese porcentaje de aminoácidos son los mismos en la comparación de las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la ref. 120. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman determina una alineación preferida utilizando una búsqueda de espacio afín con una penalización por apertura de espacio de 12 y una penalización de extensión de espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología SmithWaterman se describe en la ref. 121.

[0150] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Adyuvantes de aluminio

[0151] Se estudió la adsorción de fHBP a diferentes adyuvantes de aluminio bajo diferentes condiciones. Se usaron varios antígenos fHBP, incluido un solo fHBP (pl predicho de 7,4) o mezclas híbridas de 2 o 3 fHBP. Algunos experimentos incluyeron antígenos meningocócicos no fHBP adicionales.

[0152] Con un adyuvante de hidróxido de aluminio a pH 6,5 + 0,5, se observó una adsorción del 100% de fHBP con todos los antígenos simples y mixtos. La adsorción completa también se observó a un pH ligeramente más alto en presencia de tampón de histidina 10 mM. La presencia de adyuvantes de polipéptidos meningocócicos adicionales no redujo el grado de adsorción de fHBP.

[0153] Por el contrario, con un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio a pH 7,0 el antígeno fHBP sólo se adsorbió al 50%. Este pH está por debajo del pI predicho del antígeno y por encima del PZC del adyuvante.

[0154] Adyuvantes de hidróxido de aluminio tienen en general un PZC de aproximadamente 11,4. Por lo tanto, el pH neutro está por debajo del PZC del adyuvante. En contraste, el pH neutro está por encima de PZC del adyuvante de hidroxifosfato de aluminio.

[0155] La adsorción de fHBP a un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio se estudió a diferentes pH. Los siguientes datos muestran los datos de pH y adsorción obtenidos 24 horas después de la formulación. Estas tres formulaciones tienen la misma proteína de concentración (50 µg/ml) y la concentración de adyuvante (0,5 mg/ml), pero el uso de un tampón de fosfato de sodio 10 mM a diferentes pH:

pH	% de adsorción
7,0	~50%
5,8	~95%
3,5	no adsorbido

[0156] Por lo tanto se logró adsorción al ~95% en una composición de pH 5,8. Este pH es aproximadamente igual al PZC del adyuvante (ligeramente más alto) pero está muy por debajo del pI del antígeno. Por el contrario, a un pH aumentado (1,2 unidades de pH más altas) o una adsorción disminuida del pH (2,3 unidades de pH más bajas) fue pobre.

[0157] También se podría lograr un alto nivel de adsorción aumentando la cantidad de adyuvante 4,5 veces.

[0158] La influencia de tampón y pH se estudió en experimentos adicionales usando 1 mg/ml de adyuvante y 100 µg/ml de antígeno. Los resultados fueron los siguientes:

Tampón	pH	% de adsorción
Fosfato de sodio 10 mM	7,1	~80%
	5,9	~95%
	5,5	~95%
	4 4	~80%
Fosfato de sodio 5 mM	6,9	~85%
	6,1	~95%
	5,9	~95%
Histidina 5 mM	7	~96%
	5,9	~98%
	5,2	~95%

[0159] Por lo tanto, se pudo lograr una alta adsorción (≥95%) al hidroxifosfato de aluminio seleccionando un pH apropiado. Los niveles de adsorción superiores al 85% se observaron aquí solo cuando el pH estaba dentro de 1,2 unidades de pH del PZC del adyuvante (en el tampón relevante).

[0160] Como se mencionó anteriormente, estos estudios se realizaron con un fHBP que tiene un pI de 7,4. Este fHBP se denominará en lo sucesivo como fHBP-v1. Se realizaron más estudios con fHBP de dos cepas meningocócicas más. El pI predicho para fHBP-v2 es 5,8, y para fHBP-v3 es 6,1. Además, se estudió una fusión para combinar los tres v1, v2 y v3. Cada una de estas cuatro proteínas se formuló a 100 µg/ml con 0,222 mg/ml de adyuvante y 9 mg/ml de NaCl. Se investigaron tres formulaciones diferentes de pH, a saber, pH 5, pH 6 y pH 7. Luego se determinó el grado de adsorción de las proteínas fHBP al hidroxifosfato de aluminio. Los resultados fueron los siguientes:

	pI	Adsorción a pH		
		5	6	7
v1	7.4	20-40%	90-95%	40-60%
v2	5.8	>95%	>95%	<25%
v3	6.1	90-95%	>95%	80-85%
v1+v2+v3	-	>95%	>95%	85-90%

[0161] Estos resultados confirman que la combinación v1/v2/v3, que incluye un fHBP con un pl de 5,8 y otro con un pl de 6,1 (es decir, ambos entre 5,0 y 7,0), podría alcanzar niveles de adsorción de $\geq 85\%$ usando un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio con un PZC entre 5,0 y 7,0. Además, los niveles más altos de adsorción para esta combinación se observaron cuando el pH estaba dentro de 1,2 unidades de pH del punto de carga cero del adyuvante (es decir, a pH 5 o pH 6, en lugar de a pH 7).

[0162] Se observó alta adsorción excepto (i) para v1 y v2, cuando el pH fue de más de 1,2 unidades más alto que el PZC del adyuvante (ii) para v1, cuando el pH fue menor que PZC del adyuvante y pl de la fHBP estaba fuera del rango de 5,0 a 7,0. La adsorción relativamente baja de v2 fHBP a pH 7 podría superarse agregando un segundo fHBP con un pl en el rango de 5,0 a 7,0.

[0163] Por lo tanto, las mezclas de múltiples variantes de fHBP con diferentes valores de pl pueden formularse con éxito con altos niveles de adsorción sin requerir hidróxido de aluminio.

[0164] Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y que se pueden hacer modificaciones sin dejar de estar dentro del alcance de la invención.

REFERENCIA

[0165]

- [1] Massignani et al. (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
- [2] Welsch et al. (2004) *J Immunol* 172:5605-15.
- [3] Hou et al. (2005) *J Infect Dis* 192(4):580-90.
- [4] WO03/063766.
- [5] Fletcher et al. (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100.
- [6] Zhu et al. (2005) *Infect Immun* 73(10):6838-45.
- [7] Cantini et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:7220-7227
- [8] WO2004/048404
- [9] WO03/020756.
- [10] Sturgess et al. (1999) *Vaccine* 17:1169-1178.
- [11] Patente de EE.UU. 7,404,960.
- [12] Giuliani et al. (2006) *PNAS USA* 103:10834-9.
- [13] Hem & HogenEsch (2007) Capítulo 4 de *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems* (ed. Singh).
- [14] Burrell et al. (2001) *Vaccine* 19:275-81.
- [15] *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 42 (ed. O'Hagan) *Vaccine Adjuvants...*
- [16] WO01/22992.
- [17] Bjellqvist et al. (1993) *Electrophoresis* 14:1023-31.
- [18] Gasteiger et al. (2005) *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server in The Proteomics Protocols Handbook* (ed. John M. Walker), Humana Press (2005).
- [19] Tettelin et al. (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [20] WO00/66741.
- [21] WO99/57280
- [22] Martin et al. (1997) *J Exp Med* 185(7):1173-83.
- [23] WO96/29412.
- [24] US-5,698,438.
- [25] Perkins-Balding et al. (2003) *Microbiology* 149:3423-35.
- [26] WO01/55182.
- [27] WO01/38350.
- [28] WO00/23595.
- [29] Ram et al. (2003) *J Biol Chem* 278:50853-62.
- [30] WO2004/014417.
- [31] WO98/53851
- [32] US-6531131
- [33] WO00/26384.
- [34] US-6645503
- [35] WO03/070282.
- [36] WO94/08021
- [37] WO2004/015099.
- [38] WO2007/144316.
- [39] WO2007/144317.
- [40] WO03/080678.
- [41] Glode et al. (1979) *J Infect Dis* 139:52-56
- [42] WO94/05325; Patente EE.UU. 5,425,946.
- [43] Arakere & Frasch (1991) *Infect. Immun.* 59:4349-4356.
- [44] Michon et al. (2000) *Dev. Biol.* 103:151-160.

- [45] Rubinstein & Stein (1998) *J. Immunol.* 141:4357-4362.
- [46] WO2005/033148
- [47] WO2007/000314.
- 5 [48] Research Disclosure, 453077 (enero 2002)
- [49] EP-A-0378881.
- [50] EP-A-0427347.
- [51] WO93/17712
- [52] WO94/03208.
- [53] WO98/58668.
- 10 [54] EP-A-0471177.
- [55] WO91/01146
- [56] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [57] Baraldo et al. (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
- [58] EP-A-0594610.
- 15 [59] Ruan et al. (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
- [60] WO00/56360.
- [61] Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [62] Michon et al. (1998) *Vaccine.* 16:1732-41.
- [63] WO02/091998.
- 20 [64] WO01/72337
- [65] WO00/61761.
- [66] WO00/33882
- [67] WO2007/000341.
- [68] Bethell G.S. et al., *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 2572-4
- 25 [69] Hearn M.T.W., *J. Chromatogr.*, 1981, 218, 509-18
- [70] WO2007/000343.
- [71] *Mol. Immunol.*, 1985, 22, 907-919
- [72] EP-A-0208375
- [73] WO00/10599
- 30 [74] Gever et al., *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979).
- [75] Patente de EE.UU. 4,057,685.
- [76] Patentes de EE.UU. 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [77] Patente de EE.UU. 4,459,286.
- [78] Patente de EE.UU. 5,204,098
- 35 [79] Patente de EE.UU. 4,965,338
- [80] Patente de EE.UU. 4,663,160.
- [81] WO2007/000342.
- [82] Informe Técnico OMS Serie N° 927, 2005. Páginas 64-98.
- 40 [83] US-2008/0102498.
- [84] US-2006/0228381.
- [85] US-2007/0231340.
- [86] US-2007/0184072.
- [87] US-2006/0228380.
- [88] WO2008/143709.
- 45 [89] WO2007/071707
- [90] US-2007/0184071.
- [91] Jodar et al. (2003) *Vaccine* 21:3265-72.
- [92] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [93] WO2007/127665.
- 50 [94] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [95] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [96] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 55 [97] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [98] Ausubel et al. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5ª edición (Current Protocols).
- [99] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press)
- [100] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- 60 [101] Geysen et al. (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [102] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
- [103] Jameson, BA et al. 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- [104] Raddrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
- [105] Bublil et al. (2007) *Proteins* 68(1):294-304.
- 65 [106] De Lalla et al. (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [107] Kwok et al. (2001) *Trends Immunol* 22:583-88.

[108] Brusic et al. (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30
 [109] Meister et al. (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
 [110] Roberts et al. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
 [111] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
 5 [112] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
 [113] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
 [114] Welling et al. (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
 [115] Davenport et al. (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
 [116] Tsurui & Takahashi (2007) *J Pharmacol Sci.* 105(4):299-316.
 10 [117] Tong et al. (2007) *Brief Bioinform.* 8(2):96-108.
 [118] Schirle et al. (2001) *J Immunol Methods.* 257(1-2):1-16.
 [119] Chen et al. (2007) *Amino Acids* 33(3):423-8.
 [120] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) *Supplemento* 30
 [121] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0166]

SEQ ID NO: 1 (HBP-1)

VAADIGAGLADALTAAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEV
 DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDD
 AGGKLTYYTIDFAAKQGGHKGIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSA
 EVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 2 (HBP-2)

VAADIGAGLADALTAAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEV
 DGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDA
 GGKLTYYTIDFAAKQGGHKGIEHLKTPQNVVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSAT
 VKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 3 (HBP-3)

VAADIGTGLADALTAAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRDFVQK
 IEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSS
 DDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYYHLALFGDRAQEIAG
 SATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 4 (HBP)

VTADIGTGLADALTAAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTSLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEV
 DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDD
 AGGKLTYYTIDFAAKQGGHKGIEHLKSPENVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGKAQEVAGSA
 EVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 5 (HBP)

VAADIGAGLADALTAAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRDFVQK
 IEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIVGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFG
 SDDAGGKLTYYTIDFAAKQGGHKGIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAG
 SAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 6 (HBP)

VAADIGTGLADALTAAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTSLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRDFVQK
 IEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSS
 DDAGGKLTYYTIDFAAKQGGHKGIEHLKTPQNVVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYYHLALFGDRAQEIAG
 SATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 7 (HmBR)

MKPLQMLPIAALVGSIFGNPVLAADEAATETTPVKAEIKAVRVKQORNAPAAVERVNLNRIKQEMIRDNKDLVRYST
 DVGLSDSGRHKQGFVAVRGEVGNRVGVSIDGVNLPDSEENSLYARYGNFNSSRLSIDPELVRNIEIVKGDASFNTGSG
 ALGGGVNYQTLQGRDLLDDRRQFGVMMKNGYSTRNREWTNLTGFGVSNDRVDAALLYSQRRGHETESAGNRGYAVEG
 60 EGGGANIRGSARGIPDSSKHKYHHLGKIAYQINDNHRIGASLNGQQGHNYTVEESYNLTASSWREADDVNRNRNA
 NLFYEWMPDSNWLSSLKADFDYQKTKVAAVNNKGSFPMDYSTWTRNYNQKDLDEIYNRSMDFRFRFTLRRLDHPQLQ
 LGGGRHRLSFKTFVSRDFENLNRDDYFSGRVVRTSSIQHPVKTNYGFSLSDQIQWNVDFSSRAGIRYDHTKMT
 PQELNAECHADKTPPAANTYKGSVGLAAQLNQAWRVGYDITSGYRVPNASEVYFTYNHGSGNWLPNPNLKAER
 STHTLSQLGRSEKGMLDANLYQSNYRNFLEEQLTTSSTPGCTEENAYYGICSDPYKEKLDWQMKNI DKARIRGI
 ELTGRNLNVKVASFVPEGWKLFGSLGYAKSKLSDGNSLLSTQPLKVIAGIDYESPSEKGVFSRLTYLGAKKVKDAQ
 65 YTVYENKGVGTPLQKQKVDYVWLNKSAVYVDMYGFYKPAKNLTLRAGVYVNLFRKYYTWDLSRGLYSYSTNAVDRD
 GKGLDRYRAPGRNYAVSLEWKF

SEQ ID NO: 8 (HmbR)

MKPLQMLPIAALVGSIFGNPVFAADEAATETTPVKAEVKAVRVKQQRNAPAAVERVNLNRIKQEMIRDNDKLVRYST
DVGLSDSGRHQKGFVAVRGVEGNRVGVSIDGVNLPDSEENSLYARYGNFNSSRLSIDPELVRNIDIVKGADSFNTGSG
5 ALGGGVNYQTLQGRDLLPERQFGVMMKNGYSTRNREWTNTLGFVSNDRVDAALLYSQRRGHETESAGKRGYPVEG
AGSGANIRGSARGIPDPSQHKYNHHLGKIAYQINDNHRI GASLNGQQGHNYTVEESYNLLASYWREADDVNRNRNT
NLFYEWTPESDRLSMVKADVDYQKTKVSAVNYKGSFPIEDSSTLTRNYNQKDLDEIYNRSMDFRFRITLRLDLSHPL
QLGGGRHRLSFKTFASRRDFENLRDDYFSGRVVTTSSIQHPVKTNYGFLSDQIQWNDVSSRAGIRYDHTKM
10 TPQELNAECHACDKTPPAANTYKGSVGFVGLAAQLNQAARVGYDITSGYRVPNASEVYFTYNHSGSNWLPNPNLKA
RTTHTLTLQGRSEKGLDANLYQSNYRNFLSEEQKLTSGDVSCQMNYYYGMCNPNYSEKLEWQMNIKARIRG
IELTGRNLVNDKVASFVPEGWKLFGSLGYAKSKLSGDNLSLSTQPLKVIAGIDYESPSEKVGWFSRLTYLGAKKVKDA

QYTVYENKGGWTPLOKKVKDY PWNLSAYVDFMYGFYKPVKNLTLRAGVYVFNRYKTTWDSLRLGLYSYSTTNSVD
DGKGLDRYRAPSRYAVSLEWKF

SEQ ID NO: 9 (287)

MFKRSVIAMACIFALSACGGGGGSPDVKSADTLSPKAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSAGSQSODMAAVSE
ENTGNGGAVTADNPKNEDEVAQNMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMAAADGMQ
20 GDDPSAGGQAGNATAAQGANQAGNNQAGSSDPI PASNPAPANGGNSFRVLDLANGVLIDGPSQNI TLTHCKGSDCS
GNNFLDEEVQLKSEFEKLSADAKISNYKDGKNDKFLVGLVADSVMKGINQYIIFYKPKPTSFAFRFRSARSRRSLP
AEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGAAYVNGEVL
HFHTENGRPYTRGRFAAKVDFGSKSV DGIIDSGDDLHMGTKFKAAIDGNGFKGTWTEGSGDVSCKFYGPAGEEV
AGKYSYRPTDAEKGGGFGVAGKKEQD

SEQ ID NO: 10 (NadA)

MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDGEDGITQKDATAAD
VEADDFKGLGLKVVNTLTKTVNENKQNVDAKVAEASEIEKLTTLKADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENITT
FAEETKTNIKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAETKQNVDAKVAEATAAG
30 KAEAAAGTANTAADKAEVAKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNV
GRFNVTAAVGGYKSESVAIIGTGRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAHYHGVNYEW

SEQ ID NO: 11 (NspA)

MKKALATLIALALPAAALAEAGSGFYVQADAHAHAKASSLSGSAKGFSPRISAGYRINDLRFVADYTRYKNYKAPSTD
FKLYSIGASAIYDFDTQSPVKPYLGARLSLNRASVDLGGSDSFSQTSIGLVLTGVSAYVTPNVDL DAGRYNYIGK
35 VNTVKNVRSSELGSAVVRVKE

SEQ ID NO: 12 (NhhA)

MNKIYRIWNALNAWVVSELTRNHTKRASATVKTAVLATLLFATVQASANNEEQEEDLYLDPVQRTVAVLIVNSD
KEGTGEKEKVEENS DWAVYFNEKGVLTAREITLAKAGDNLKI KQNGTNFTYSLKKDLTDLTSVGT EKL SFSANGNKVN
ITSDTKGLNFAKETAGTNGD TT VHLNGIGSTLTD TLLNTGATTNVTNDNVTDDEKKRAASVKDVLNAGWNIKGVKPG
40 TTASDNVDFVRYDTVEFLSADTKTTVNVESKDNKGKTEVKIGAKTSVIKEKDGKLVTKDKGGENSSSTDEGEGLV
TAKEVIDAVNKAGWRMKT TTANGQTGQADKFETVTSGTNVT FASGKGTATVSKDDQGNITVMYDVNVGDALNVNL
QNSGWNLD SKAVAGSSGKVISGNVSPSKGKMDETVNIAGNIEITRNGKNI DIATSMT PQFSSVSLGAGADAP TLS
45 VDG DALNVGSKKDNKPVRI TNVAPGVKEGDVTNVAQLKGVAQLNLRINDNVDGNARAGIAQAIATAGLVQAYLPGKS
MMAIGGGTYRGEAGYAI GYSSISDGGNWI IKTASGNSRGHFGASASVGYQW

SEQ ID NO: 13 (App)

MKTTDKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYQYRDFAEKNGKFAVGAKDIEVYNKK
GELVGSMTKAPMIDFSVSRNGVAALVGDQYIVSVAHNGGYNVDFGAEGRNPDQHRFTYKIVKRNNYKAGTKGHP
50 YGGDYHMPRLHKFVTD AEPVEMTSYMDGRKYIDQNNYPDRVRIGAGROYWRSDEDEPNNRESSYHIASAYSWLVGGN
TFAQNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGF LPTGGSGDSDGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQTGNPYIGKSNGFQLVKDF
YDEIFAGDTHSVFYEPQNGKYSFNDDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYHAGGVNSY
RPRLNNGENISFIDEGKGELI L TSNINQAGAGLYFQGDFTVSPENNETWQAGAVHISEDSTVTKVNGVANDRLSKI
55 GKGT LHVQAKGENQGSISVGDGTVILDQQADDKGGKQAFSEI GLVSGRGTVQLNADNQFNPKLYFGFRGRLDLNG
HLSLFHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVITITGNKDIATTGNNSLDSKKEIAYNGWFGKEDTTKTNGRLNLVYQPA
EDRTL LLSGGTNLNGNITQTNGKLF FSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEI VWDNDWINRTFKAENFQIKGGQAV
VSRNVAKVKGDWHLNSHAQAVFGVAPHQSH TICTRSDWTGLTNCVEKITDDKVIASLTKTDISGNVDLADHAHLNL
TGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGTNSAGNASFNLSDHAVQNGSLT LSGNAK
60 NVSHSALNGNVS LADKAVFHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDEWTLPSGTELGNLNLNATITLNSAYRHDAAGA
TGSATDAPRRRSRRSRLSVTPPTSVESRFNTLTVNGKLNQGTFRFMSSELFYRS DKLKLAESSEGT YTLAVNN
TGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLF TLQNEHV DAGAWRYQLIRKDG EFR LHNVPVKEQELS DKL GKAEAKKQAEK
DNAQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENV GIMQAE EKKRVQADKDTALAKQREAE TRPATTA FRARRAR
65 RDLPQLQPQPQPQRDLISRYANGLSEFSATLNSVFAVQDELDRVFAEDRRNAVWTS GIRDTKHYRSQDFRAYRQ
QTDLRQIGMQKNLGSGRVLGILF SHNRTE FDDGIGNSARLAHGA VFGQYIGDRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGK
IRRRVLHYGIQARYRAGFGGGFIEPHIGATRYFVQKADYRENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQHISITPY
LSLSYTDASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGNVNAEIKGFTLSLHAAAAGKPOLQAQHSAGIKLGYRW

SEQ ID NO: 14 (Omp85)

MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGDYNDTHGSAI IKSLYATGFFDDVVRVE
TADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQSQYFNQATLNQAVAGLKEEYLRGKLNQITPKV
TKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIEFEGNQVYSDRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRSNQFNEQKFAQDMEKVTDFYQN
NGYFDFRILDITDIQTNEKTKQTIKIVHEGGRFRWGVKSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWERQOMTAVLGEI
QNRMGSAAYAYSEISVQPLPNAETKTVDVFLHIEPGRKIYVNEIHITGNKTRDEVVRRRELQRMESAPYDTSKLRQS
KERVLLGYFDNVQFADAVPLAGTPDKVDLNMSLTERSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASR

5

SKTTLNGSLSFTDPYFTADGVSLGYDVYKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVN
TYNKAPKHYADFIKKYKGTGDTDGSFKWLYKGTVGWGRNKTDLSALWPTRGYLTGVNAEIALPGSKLQYYSATHNQ
WFFPLSKFTTLMGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSRVGYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAEL
LFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDGKTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPM
KFSYAYPLKKKPEDEIQRFFQLGTTT

10

SEQ ID NO: 15
GSGGGG

15

SEQ ID NO: 16
GSGSGGGG

20

SEQ ID NO: 17
HHHHHH

SEQ ID NO: 18
ICICICICICICICICICIC

25

SEQ ID NO: 19
KLKLLLLLKLK

SEQ ID NO: 20

MNRFAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLPKPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGHGKIEHLKSPKLNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSV
LYNQAQKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

30

SEQ ID NO: 21

MNRFAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSAQGA
NGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRQFRIGDIA
GEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQGHGKIEHLKTPKLNVDLAAAEKKADEKSHAVILGDR
YGESEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

35

SEQ ID NO: 22

MNRFAFCCLSLTTALILTACSSGGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSAQGA
EKTFFKAGDKDNLNTGKLNKDKVSRFDFVQKIEVDGQITTLASGEFQYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRQFRIGDIA
SFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPKLNVDLAAAEKKADEKSH
AVILGDRYGESEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

40

SEQ ID NO: 23

CSSGGGGSGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTTLTSAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDK
VSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGHGKIEHLKSPKLNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAQKGSYSLG
IFGEKAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

50

SEQ ID NO: 24

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTTLTSAQGAERTFKAGDKDNLNTGKLNK
DKVSRFDFVQKIEVDGQITTLASGEFQYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGHGKIEHLKSPKLNVDLAAADIKPDKHHAVISGSVLYNQAQKGSYSL
GIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

55

SEQ ID NO: 25

CSSGSGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTTLTSAQGAERTFKVGDKDNLSNTGKLNK
DKVSRFDFVQKIEVDGQITTLASGEFQYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGHGKIEHLKTPKLNVDLAAAEKKADEKSHAVILGDRYGESEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición inmunogénica que comprende dos antígenos meningocócicos fHBP diferentes, ambos adsorbidos al adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en donde (i) los dos antígenos meningocócicos fHBP tienen un punto isoeléctrico entre 5,0 y 7,0, (ii) el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene un punto de carga cero entre 5,0 y 7,0, y (iii) la composición incluye un tampón para mantener el pH en el rango de 5,0 a 7,0.
- 10 **2.** Un método para adsorber dos antígenos meningocócicos fHBP diferentes a un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio para dar una composición inmunogénica, en la que (i) ambos antígenos meningocócicos fHBP tienen un punto isoeléctrico entre 5,0 y 7,0, (ii) el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene un punto de carga cero entre 5,0 y 7,0, y (iii) la adsorción de ambos antígenos fHBP tiene lugar a un pH entre 5,0 y 7,0 en presencia de un tampón.
- 15 **3.** El método o composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los dos antígenos meningocócicos fHBP tienen un punto isoeléctrico entre 5,0 y 6,0.
- 4.** El método o composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el hidroxifosfato de aluminio tiene un isoeléctrico punto entre 5,0 y 6,0.
- 20 **5.** El método o composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que (i) ambos antígenos meningocócicos fHBP tienen un punto isoeléctrico entre 5,0 y 6,0 y (ii) el hidroxifosfato de aluminio tiene un punto isoeléctrico entre 5,0 y 6,0.
- 6.** El método o composición de la reivindicación 5, en donde el tampón mantiene el pH en el rango de 5,0 a 6,0.
- 25 **7.** La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el tampón mantiene el pH dentro de 0,5 unidades de pH del punto del adyuvante de carga cero.
- 8.** La composición o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los dos antígenos fHBP diferentes son:
- 30 (i) un primer y segundo polipéptido; (ii) un primer y tercer polipéptido; o (iii) un segundo y tercer polipéptido, seleccionado desde:
- 35 (a) un primer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos 84% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y/o (ii) que consiste en un fragmento de al menos 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1
- (b) un segundo polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos 84% de identidad de secuencia para SEQ ID NO: 2 y/o (ii) que consiste en un fragmento de al menos 20 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2;
- 40 (c) un tercer polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos 84% de identidad de secuencia para SEQ ID NO: 3 y/o (ii) que consiste en un fragmento de al menos 20 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 3.
- 45 **9.** La composición o método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde los dos antígenos fHBP diferentes son: (i) un primero y segundo polipéptido; (ii) un segundo y tercer polipéptido, seleccionado de:
- (a) un primer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- 50 (b) un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6;
- (c) un tercer polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.
- 10.** La composición o método de cualquier reivindicación precedente, en donde los dos antígenos fHBP diferentes son: (a) un primer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4; y (b) un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.
- 55 **11.** La composición o método de la reivindicación 10, en donde el primer polipéptido es una lipoproteína que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y el segundo polipéptido es una lipoproteína que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25.
- 60 **12.** La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición no incluye un adyuvante de hidróxido de aluminio.
- 65 **13.** La composición de la reivindicación 12, que comprende un sacárido capsular bacteriano conjugado.

14. La composición o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los polipéptidos fHBP están lipidados en una cisteína de extremo N, en donde el lípido comprende palmitoilo.
- 5 15. La composición o método de cualquier reivindicación precedente, en donde el hidroxifosfato de aluminio tiene un PZC entre 5,4 y 6,2.
16. La composición o método de cualquier reivindicación precedente, en donde el hidroxifosfato de aluminio tiene una relación molar P/Al entre 0,85 y 1,0.
- 10 17. La composición o método de cualquier reivindicación precedente, en donde el hidroxifosfato de aluminio es amorfo y partículas que comprenden placas con diámetros de 10-100 nm.
- 15 18. La composición o método de cualquier reivindicación precedente, en donde la concentración de Al⁺⁺⁺ es <2 mg/ml.