

SIB EX5691R

P054136SM:CJM/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo
domanda n° **10713516.2**, pubblicazione n° **2411048**
a nome di **GlaxoSmithKline Biologicals SA**
di **Rue de l'Institut 89, 1330 Rixensart, Belgio**

* * * * *

"PROTEINA LEGANTE FATTORE H DI MENINGOCOCCO COME ADIUVANTE"

DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO

La presente invenzione è nel campo di vaccini per meningococco, in particolare quelli contenenti antigeni fHBP.

TECNICA FONDAMENTALE

Neisseria meningitidis (meningococco) è un batterio sferico Gram-negativo. Gli attuali vaccini per meningococco si basano anche sui saccaridi capsulari. Questi includono vaccini coniugati di sierogruppo C monovalenti e miscele coniugate 4-valenti per sierogruppi A, C, W135 e Y. Attualmente non esiste un vaccino utile autorizzato per l'uso generale contro il sierogruppo B ("MenB").

Un antigene che è stato proposto per l'uso nell'immunizzazione contro MenB è la proteina legante il fattore H (fHBP). Questo antigene è stato anche chiamato proteina '741' (SEQ ID 2535 e 2536 in riferimento 21), 'NMB1870', 'GNA1870' [rif. 1-3], 'P2086', 'LP2086' o 'ORF2086' [4-6]. La proteina è stata ben studiata. In natura è una lipoproteina ed è espressa in tutti i sierogruppi di meningococco. La struttura del dominio immunodominante C-terminale di fHbp ('fHbpC') è stata determinata mediante NMR [7]. Questa parte della proteina forma un barile β a otto filamenti, i cui filamenti sono collegati da anse di lunghezze variabili. Il barile è preceduto da una breve elica α e da una coda N-terminale flessibile.

L'antigene fHBP rientra in tre distinte varianti [8] ed è stato riscontrato che il siero suscitato contro una determinata famiglia è battericida all'interno della stessa famiglia, ma non è attivo contro i ceppi che esprimono una delle altre due famiglie *cioè* esiste una protezione incrociata intra-famiglia, ma non una protezione incrociata inter-famiglie. Pertanto, il riferimento 8 propone di combinare diverse varianti di fHBP in una singola composizione vaccinale, aumentando così la copertura dei ceppi, sia come miscela di proteine separate o come proteina di fusione delle diverse varianti (queste ultime sono "proteine tandem").

Il riferimento 9 riporta anche una proteina tandem fHBP (pagine 18-19 del riferimento 9). Questa proteina tandem è stata purificata e miscelata con fosfato di alluminio come adiuvante, ma è stato riferito che non si adsorbe bene sull'adiuvante. È desiderabile un buon adsorbimento degli antigeni, ed è stato trovato che tali proteine miste di fHBP si adsorbono facilmente se come adiuvante si usa invece idrossido di alluminio.

Un problema quando si usa idrossido di alluminio come adiuvante, tuttavia, è che può degradare determinati antigeni. Ad esempio, il riferimento 10 riporta che può idrolizzare vaccini coniugati di *H.influenzae* tipo B, anche a basse temperature, portando così a ridotta efficacia. Allo stesso modo, idrolisi di saccaride capsulare Vi di *S.typhi* in presenza di idrossido di alluminio è riportata nel riferimento 11. Pertanto può essere desiderabile formulare antigeni usando un adiuvante a base di fosfato di alluminio, in particolare se il vaccino adiuvato può essere miscelato (durante la fabbricazione o al momento dell'uso) con un antigene che può essere suscettibile di danni da idrossido di alluminio ad es. un saccaride capsulare batterico coniugato.

Pertanto, è necessario fornire formulazioni di fHBP, e in particolare di più varianti di fHBP, in cui l'fHBP (gli fHBP) è/sono adsorbiti da un adiuvante ma che non richiedono idrossido di alluminio.

L'Abstract P100 (Anderson *et al.*) delle presentazioni tenute alla sedicesima IPNC a Rotterdam nel 2008 riporta l'immunogenicità di un vaccino sperimentale contenente due proteine ricombinanti di fHBP lipidate che rappresentano le sottofamiglie di sequenza A e B, insieme ad un adiuvante di fosfato di alluminio. I macachi *Cynomolgus* sono stati immunizzati per via intramuscolare con proteine rLP2086 (A + B) adsorbite su AlPO₄ a vari dosaggi proteici. Gli autori concludono che (i) il vaccino suscita anticorpi battericidi specifici della sottofamiglia e (ii) l'immunogenicità è stata migliorata con l'inclusione dell'adiuvante.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Gli inventori hanno identificato tecniche generali per ottenere un adsorbimento efficiente delle proteine fHBP su adiuvanti di idrossifosfato di alluminio. L'uso di idrossifosfato di alluminio può evitare la necessità di usare idrossido di alluminio, e le tecniche degli inventori evitano l'adsorbimento inefficiente descritto nel riferimento 9. Le tecniche di adsorbimento sono particolarmente utili per composizioni che includono più varianti di fHBP.

L'invenzione fornisce:

- Un metodo per adsorbire due antigeni fHBP di meningococco differenti su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio per dare una composizione immunogenica, in cui (i) entrambi gli antigeni fHBP di meningococco hanno un punto isoelettrico tra 5,0 e 7,0, (ii) l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio ha un punto di carica zero tra 5,0 e 7,0, e (iii) l'adsorbimento di entrambi gli antigeni fHBP avviene ad un pH tra 5,0 e 7,0 in presenza di un

tampone.

- Una composizione immunogenica comprendente due antigeni fHBP di meningococco differenti, entrambi i quali sono adsorbiti su adiuvante di idrossifosfato di alluminio, in cui (i) entrambi gli antigeni fHBP di meningococco hanno un punto isoelettrico tra 5,0 e 7,0, (ii) l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio ha un punto di carica zero tra 5,0 e 7,0, e (iii) la composizione include un tampone per mantenere il pH nell'intervallo di 5,0 fino a 7,0.

L'adsorbimento di fHBP può avvenire a un pH uguale o inferiore al punto di carica zero dello idrossifosfato di alluminio (PZC). Per un dato adiuvante di idrossifosfato di alluminio, quindi, un mezzo acquoso (ad es. tampone) verrebbe scelto con un pH uguale o inferiore al PZC dell'adiuvante. Al contrario, per un dato pH verrebbe scelto un idrossifosfato di alluminio che ha lo stesso PZC o superiore. Questa selezione di pH e PZC può dare composizioni immunogene in cui fHBP viene stabilmente adsorbito su un idrossifosfato di alluminio.

Nel metodo dell'invenzione, un fHBP e un adiuvante di idrossifosfato di alluminio sono scelti in modo tale che l'fHBP abbia un punto isoelettrico (pI) nell'intervallo da 5,0 a 7,0 (inclusi) e il PZC dell'adiuvante sia scelto all'interno dello stesso intervallo. Garantendo questa stretta corrispondenza di caratteristiche dell'antigene e dell'adiuvante è possibile ottenere composizioni adsorbite stabili anche se il pH di adsorbimento è superiore al PZC dell'adiuvante. L'adsorbimento stabile è facilitato dalla presenza di un tampone in grado di mantenere il pH anche nell'intervallo da 5,0 a 7,0.

Se un fHBP ha un punto isoelettrico al di sopra del PZC di un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, è possibile aggiungere un tampone per portare il pH entro 1,2 unità di pH del PZC.

In un metodo per adsorbire un antigene fHBP di meningococco su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, l'adsorbimento può avvenire a un pH uguale o inferiore al punto di carica zero dell'idrossifosfato di alluminio. L'antigene fHBP adsorbito può essere usato come immunogeno. L'adsorbimento può essere eseguito in vari modi. La miscelazione di antigeni fHBP, idrossifosfato di alluminio e un tampone può avvenire in qualsiasi ordine adatto, sia combinando tutti e tre i componenti separatamente o pre-miscelando due componenti e quindi miscelando la pre-miscelazione con il terzo componente.

In una composizione immunogenica che comprende un antigene di meningococco fHBP e un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio può avere un punto di carica zero che è superiore al pH della composizione immunogenica.

In un metodo per adsorbire un antigene fHBP di meningococco in un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, in cui l'antigene di meningococco fHBP ha un punto isoelettrico che è maggiore del punto di carica zero dell'adiuvante, l'adsorbimento può avvenire a un pH che è entro 1,2 unità di pH dal punto di carica zero dell'adiuvante. Il pH durante l'adsorbimento è preferibilmente ottenuto includendo un tampone che mantiene il pH entro 1,2 unità di pH dal punto di carica zero dell'adiuvante.

In una composizione immunogenica comprendente un antigene di meningococco fHBP adsorbito su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, dove l'antigene di meningococco fHBP ha un punto isoelettrico che è maggiore del punto di carica zero dell'adiuvante, allora la composizione può avere un pH che è entro 1,2 unità di pH dal punto di carica zero dell'adiuvante. La composizione può includere un tampone che mantiene il pH entro 1,2 unità di pH dal PZC dell'adiuvante.

Le composizioni dell'invenzione includono più di un fHBP. Come accennato sopra, in precedenza è stato riportato che tali composizioni non si adsorbono bene su adiuvanti di alluminio con gruppi fosfato.

L'adsorbimento di due antigeni di fHBP può avvenire ad un pH uguale o inferiore al punto di carica di zero dell'idrossifosfato di alluminio. Gli antigeni fHBP adsorbiti possono essere usati per l'immunizzazione da meningococco ad ampio spettro. La miscelazione di antigeni fHBP e idrossifosfato di alluminio (e un tampone) può avvenire in qualsiasi ordine adatto.

Nelle composizioni dell'invenzione, ciascun antigene fHBP è preferibilmente adsorbito per almeno l'85%, come descritto più dettagliatamente in seguito.

Proteina(e) legante il fattore H

Le composizioni dell'invenzione includono due diversi antigeni della proteina legante il fattore H del meningococco (fHBP). Queste sono preferibilmente varianti diverse come descritto nel riferimento 8. fHBP differenti genereranno risposte immunitarie distinte che non sono completamente reattive trasversalmente e che

forniscono uno spettro più ampio di copertura di ceppi contro i meningococchi.

Una composizione dell'invenzione può comprendere due dei seguenti:

(a) un primo polipeptide comprendente una prima sequenza amminoacidica, dove la prima sequenza amminoacidica comprende una sequenza amminoacidica (i) avente almeno $a\%$ di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 1 e/o (ii) costituita da un frammento di almeno x amminoacidi contigui da SEQ. ID. N.: 1;

(b) un secondo polipeptide, comprendente una seconda sequenza amminoacidica, dove la seconda sequenza amminoacidica comprende una sequenza amminoacidica (i) avente almeno $b\%$ di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 2 e/o (ii) costituita da un frammento di almeno y amminoacidi contigui da SEQ. ID. N.: 2;

(c) un terzo polipeptide, comprendente una terza sequenza amminoacidica, dove la terza sequenza amminoacidica comprende una sequenza amminoacidica (i) avente almeno $c\%$ di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 3 e/o (ii) costituita da un frammento di almeno z amminoacidi contigui da SEQ. ID. N.: 3.

Quindi una composizione può comprendere: (i) un primo e secondo polipeptide come definito sopra; (ii) un primo e terzo polipeptide come definito sopra; o (iii) un secondo e terzo polipeptide come definito sopra. Una combinazione di un primo e terzo polipeptide è preferita. Una combinazione in cui ognuno dei due antigeni fHBP di meningococco differenti ha un pI tra 5,0 e 7,0 è preferita, e in particolare quando essi hanno entrambi un pI nell'intervallo di 5,0 fino a 6,0 o nell'intervallo da 5,2 a 6,2.

Due diversi antigeni di meningococco di fHBP possono condividere alcune sequenze in comune, ma il primo, il secondo e il terzo polipeptide hanno sequenze di amminoacidi di fHBP diverse.

Un polipeptide comprendente la prima sequenza di amminoacidi, quando somministrato a un soggetto, susciterà una risposta anticorpale comprendente anticorpi che si legano alla proteina di meningococco di tipo selvatico avente sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 20 (MC58). In alcune realizzazioni alcuni o tutti questi anticorpi non si legano alla proteina del meningococco di tipo selvatico con sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 21 o alla proteina del meningococco di tipo selvatico con sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 22.

Un polipeptide comprendente la seconda sequenza di amminoacidi, quando somministrato a un soggetto,

susciterà una risposta anticorpale comprendente anticorpi che si legano alla proteina di meningococco di tipo selvatico avente sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 21 (2996). In alcune realizzazioni alcuni o tutti questi anticorpi non si legano alla proteina del meningococco di tipo selvatico con sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 20 o alla proteina del meningococco di tipo selvatico con sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 22.

Un polipeptide comprendente la terza sequenza di amminoacidi, quando somministrato a un soggetto, susciterà una risposta anticorpale comprendente anticorpi che si legano alla proteina di meningococco di tipo selvatico avente sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 22 (M1239). In alcune realizzazioni alcuni o tutti questi anticorpi non si legano alla proteina del meningococco di tipo selvatico con sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 20 o alla proteina del meningococco di tipo selvatico con sequenza di amminoacidi nascente SEQ. ID. N.: 21.

In alcune realizzazioni il frammento di almeno x amminoacidi contigui da SEQ. ID. N.: 1 è anche non presente entro SEQ. ID. N.: 2 o entro SEQ. ID. N.: 3. Analogamente, il frammento di almeno y amminoacidi contigui da SEQ. ID. N.: 2 potrebbe anche non essere presente entro SEQ. ID. N.: 1 o entro SEQ. ID. N.: 3. Analogamente, il frammento di almeno z amminoacidi contigui da SEQ. ID. N.: 3 potrebbe anche non essere presente entro SEQ. ID. N.: 1 o entro SEQ. ID. N.: 2. In alcune realizzazioni, quando detto frammento da uno di SEQ. ID. N.: 1 fino a 3 è allineato come sequenza contigua contro gli altri due SEQ. ID. N., l'identità tra il frammento e ciascuno degli altri due SEQ. ID. N. è meno di 75% *ad es.* meno di 70%, meno di 65%, meno di 60%, *ecc.*

Il valore di a è di almeno 84 *ad es.* 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o più. Il valore di b è almeno 84 *ad es.* 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o più. Il valore di c è almeno 84 *ad es.* 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o più. I valori di a , b e c possono essere uguali o differenti. In alcune realizzazioni, a , b e c sono identici.

Il valore di x è di almeno 20 *ad es.* 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). Il valore di y è di almeno 20 *ad es.* 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). Il valore di z è di almeno 20 *ad es.* 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). I valori di x , y e z

possono essere uguali o differenti. In alcune realizzazioni, x , y e z sono identici.

I frammenti comprendono preferibilmente un epitopo dalla rispettiva sequenza SEQ. ID. N.:. Altri frammenti utili mancano di uno o più amminoacidi (*ad es.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o più) dal C-terminale e/o uno o più amminoacidi (*ad es.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o più) dall'N-terminale del rispettivo SEQ. ID. N.: pur conservando almeno un suo epitopo.

Le sequenze di amminoacidi usate con l'invenzione possono, rispetto a SEQ. ID. N.: 1, 2 o 3, includere uno o più (*ad es.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, *ecc.*) sostituzioni conservative di amminoacidi *cioè* sostituzioni di un amminoacido con un altro che ha una catena laterale correlata. Gli amminoacidi codificati geneticamente sono generalmente divisi in quattro famiglie: (1) acidi *cioè* aspartato, glutammato; (2) basici *cioè* lisina, arginina, istidina; (3) non polari *cioè* alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; e (4) polari senza cariche *cioè* glicina, asparagina, glutammina, cisteina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, il triptofano e la tirosina sono talvolta classificati congiuntamente come amminoacidi aromatici. In generale, la sostituzione di singoli amminoacidi all'interno di queste famiglie non ha un effetto rilevante sull'attività biologica. I polipeptidi possono avere uno o più (*ad es.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, *ecc.*) delezioni di singoli amminoacidi rispetto a una sequenza di riferimento. I polipeptidi possono anche includere uno o più (*ad es.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, *ecc.*) inserimenti (*ad es.* ciascuno di 1, 2, 3, 4 o 5 amminoacidi) rispetto a una sequenza di riferimento.

Una prima sequenza di amminoacidi utile ha almeno 85% di identità (*ad es.* > 95% o 100%) a SEQ. ID. N.: 1.

Un'altra prima sequenza di amminoacidi utile ha almeno 95% di identità (*ad es.* > 98% o 100%) a SEQ. ID. N.:

4. Un'altra prima sequenza di amminoacidi utile ha almeno il 95% di identità (*ad es.* > 98% o 100%) a SEQ. ID. N.: 5.

Una terza sequenza di amminoacidi utile ha almeno l'85% di identità (*ad es.* > 95% o 100%) a SEQ. ID. N.: 3.

Un'altra terza sequenza di amminoacidi utile ha almeno il 95% di identità (*ad es.* > 98% o 100%) a SEQ. ID. N.: 6.

Le combinazioni che comprendono una combinazione di prima e terza sequenza basate sui SEQ. ID. N.: 4 e 6 (o

le loro varianti simili) sono particolarmente utili. Un'altra utile combinazione comprende una miscela di prima e terza sequenza basata su una miscela di SEQ. ID. N.: 5 e 6 (o loro varianti simili). Pertanto una composizione può comprendere un polipeptide comprendente una sequenza di amminoacidi SEQ. ID. N.: 23 e un polipeptide comprendente una sequenza di amminoacidi SEQ. ID. N.: 25.

Una composizione dell'invenzione può essere una composizione bivalente di fHBP, oppure possono esserci più di due diversi antigeni di fHBP *ad es.* in una composizione di fHBP trivalente o tetravalente.

In alcune realizzazioni il polipeptide(i) fHBP sono lipidati *ad es.* a una cisteina N-terminale. In altre realizzazioni, tuttavia, i polipeptidi fHBP non sono lipidati. Per fHBP lipidati, i lipidi attaccati alle cisteine includeranno solitamente residui di palmitoile *ad es.* come tripalmitoil-S-gliceril-cisteina (Pam3Cys), dipalmitoil-S-gliceril cisteina (Pam2Cys), N-acetil(dipalmitoil-S-gliceril cisteina), *ecc.* Esempi di sequenze fHBP lipidate mature sono SEQ. ID. N.: 23 (incluso SEQ. ID. N.: 4), SEQ. ID. N.: 24 (incluso SEQ. ID. N.: 5) e SEQ. ID. N.: 25 (incluso SEQ. ID. N.: 6).

La somministrazione di un fHBP susciterà preferibilmente anticorpi che possono legarsi a un polipeptide di meningococco costituito da una sequenza amminoacidica SEQ. ID. N.: 1, 2 o 3. Antigeni fHBP vantaggiosi da usare con l'invenzione possono suscitare anticorpi battericidi anti-di meningococco dopo la somministrazione a un soggetto.

La quantità totale di un polipeptide fHBP sarà generalmente compresa tra 1 e 500 µg/dose *ad es.* tra 60 e 200µg/dose o tra 120 e 500µg/ml. Una quantità di 20, 40, 50, 60, 80, 100 o 200 µg per ciascun polipeptide fHBP è tipica in una dose di vaccino nell'uomo. Pertanto, un vaccino può essere formulato per includere questa quantità di ciascun fHBP.

I diversi antigeni di meningococco di fHBP possono essere presenti come polipeptidi separati come sopra descritto (*ad es.* un primo e un secondo polipeptide) o possono essere presenti come parte di un singolo polipeptide "ibrido" cioè dove almeno due (*ad es.* 2, 3, 4, 5, o più) antigeni fHBP sono espressi come una singola catena polipeptidica, come descritto per gli antigeni di meningococco nel riferimento 12.

Un polipeptide ibrido può comprendere due o tre dei seguenti: una prima sequenza di amminoacidi come definita

sopra; una seconda sequenza di amminoacidi come definita sopra; e/o una terza sequenza di amminoacidi come definita sopra.

I polipeptidi ibridi possono essere rappresentati dalla formula $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L-}\}_n\text{-B-COOH}$, in cui: X è una prima, seconda o terza sequenza di amminoacidi come definita sopra; L è una sequenza amminoacidica di associatore opzionale; A è una sequenza amminoacidica N-terminale opzionale; B è una sequenza amminoacidica C-terminale opzionale; n è un numero intero di 2 o più (*ad es.* 2, 3, 4, 5, 6, *ecc.*). Generalmente n è 2 o 3 e sono presenti almeno due di una prima, seconda e terza sequenza di amminoacidi.

Se una porzione -X- ha una sequenza peptidica *leader* nella sua forma selvatica, questa può essere inclusa o omessa nella proteina ibrida. In alcune realizzazioni, i peptidi *leader* saranno eliminati ad eccezione di quello della porzione -X- situata sull'N-terminale della proteina ibrida *cioè* il peptide *leader* di X_1 sarà mantenuto, ma i peptidi leader di $X_2 \dots X_n$ saranno omessi. Ciò equivale a cancellare tutti i peptidi *leader* e usare il peptide *leader* di X_1 come porzione -A-.

Per ogni n casi di $\{-\text{X-L-}\}$, la sequenza amminoacidica di associatore -L- può essere presente o assente. Ad esempio, quando $n = 2$ l'ibrido può essere $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, *ecc.* Le sequenze di amminoacidi di associatore -L- saranno generalmente brevi (*ad es.* 20 o meno amminoacidi *cioè* 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Gli esempi comprendono brevi sequenze di peptidi che facilitano la clonazione, associatori di poli-glicina (*cioè* comprendenti Gly_n dove $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o più) e etichette di istidina (*cioè* His_n dove $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o più). Altre sequenze di amminoacidi associatori adatti saranno evidenti agli esperti nella tecnica. Un associatore utile è GSGGGG (SEQ. ID. N.: 15) o GSGSGGGG (SEQ. ID. N.: 16), con il dipeptide Gly-Ser formato da un sito di restrizione *Bam*HI, aiutando così la clonazione e la manipolazione, e il tetrapeptide $(\text{Gly})_4$ è un tipico associatore di poli-glicina. Un altro associatore adatto, in particolare per l'uso come L_n finale è un dipeptide Leu-Glu.

-A- è una sequenza amminoacidica N-terminale opzionale. Questa sarà in genere breve (*ad es.* 40 o meno amminoacidi *cioè* 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). Esempi includono sequenze leader per dirigere il traffico di proteine o brevi sequenze di peptidi che facilitano la clonazione o la purificazione (*ad es.* etichetta di istidina *cioè* His_n dove $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o più). Altre sequenze di amminoacidi N-terminali adatte saranno evidenti agli esperti nella tecnica. Se X₁ manca della propria metionina N-terminale, -A- è preferibilmente un oligopeptide (*ad es.* con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 amminoacidi) che fornisce una metionina N-terminale *ad es.* Met-Ala-Ser, o un singolo residuo Met.

-B- è una sequenza amminoacidica C-terminale opzionale. Questa sarà in genere breve (*ad es.* 40 o meno amminoacidi *cioè* 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). Esempi includono sequenze per guidare il traffico di proteine, brevi sequenze peptidiche che facilitano la clonazione o la purificazione (*ad es.* comprendenti etichette di istidina *cioè* His_n dove $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o più, come SEQ. ID. N.: 17), o sequenze che migliorano la stabilità della proteina. Altre sequenze di amminoacidi C-terminali adatte saranno evidenti agli esperti nella tecnica.

Aiuvanti di idrossifosfato di alluminio e adsorbimento

Le composizioni dell'invenzione includono un adiuvante di idrossifosfato di alluminio. Tali adiuvanti sono spesso indicati per comodità come "fosfato di alluminio" [13], sebbene gli idrossifosfati possano essere distinti dal AlPO₄ propriamente detto per la presenza di gruppi ossidrilici. Ad esempio, una banda di spettro IR a 3164 cm⁻¹ (*ad es.* quando riscaldato a 200°C) indica la presenza di ossidrilici strutturali. L'adiuvante di idrossifosfato di alluminio può contenere una piccola quantità di solfato (*cioè* idrossifosfato solfato di alluminio) e può includere anche ioni sodio e/o cloruro [14]. L'adiuvante può essere ottenuto per precipitazione.

L'idrossifosfato di alluminio non è un composto stechiometrico e la sua composizione di ossidrilico e fosfato dipende dai reagenti e dalle condizioni di precipitazione. Questa composizione di ossidrilico/fosfato influenza il punto di carica zero dell'adiuvante (PZC; il pH a cui una superficie ha una carica netta pari a zero). Il PZC è inversamente correlato al grado di sostituzione del fosfato con ossidrilico (il rapporto molare P/Al). La sostituzione di anioni fosfati con anioni ossidrilici abbassa il PZC. Pertanto il PZC può essere alterato modificando la concentrazione di ioni fosfato liberi in soluzione (più fosfato = PZC più acido) o aggiungendo un tampone come

un tampone di istidina (rende il PZC più basico). Gli idrossifosfati di alluminio usati nell'invenzione hanno generalmente un PZC compreso tra 5,0 e 6,6 *ad es.* tra 5,4 e 6,2.

Il rapporto molare P/Al di un adiuvante di idrossifosfato di alluminio sarà generalmente compreso tra 0,3 e 1,2, preferibilmente tra 0,8 e 1,2, o tra 0,85 e 1,0 e più preferibilmente circa 0,9. Un rapporto molare P/Al di almeno 0,5 può fornire un adiuvante con migliori proprietà di invecchiamento.

L'idrossifosfato di alluminio sarà generalmente amorfo (*cioè* amorfo ai raggi X). Sarà generalmente particellare (*ad es.* morfologia a piastra come si vede nelle microfotografie di trasmissione elettronica). I diametri tipici delle piastre sono 10-100nm e formano aggregati di dimensioni 0,5-20µm (*ad es.* circa 1-10µm). Capacità di adsorbimento tra 0,7-1,5 mg di proteine per mg di Al⁺⁺⁺ a pH 7,4 sono stati riportati per adiuvanti di idrossifosfato di alluminio.

Un adiuvante tipico è l'idrossifosfato di alluminio amorfo con rapporto molare P/Al compreso tra 0,84 e 0,92 e questo adiuvante può essere incluso a 0,6 mg di Al³⁺/ml.

La concentrazione di Al⁺⁺⁺ in una composizione per la somministrazione a un paziente è preferibilmente inferiore a 5 mg/ml *ad es.* ≤4 mg/ml, ≤3 mg/ml, ≤2 mg/ml, ≤1 mg/ml, *ecc.* Un intervallo preferito è compreso tra 0,2 e 1 mg/ml. Una concentrazione massima di Al⁺⁺⁺ di 0,85 mg/dose è preferita.

Almeno 85% (in peso) di un fHBP in una composizione dell'invenzione è adsorbito su idrossifosfato di alluminio *ad es.* ≥90%, ≥95% o persino 100%. La percentuale di fHBP adsorbito può essere regolata alterando la concentrazione di sale e/o il pH durante la formulazione *ad es.* in generale, una concentrazione più elevata di NaCl può ridurre l'adsorbimento di fHBP. La quantità di adsorbimento per qualsiasi formulazione dipenderà da una combinazione di parametri tra cui il PZC dell'adiuvante, la concentrazione di sale e il pH durante la formulazione, la concentrazione dell'adiuvante, la concentrazione dell'antigene e il pI dell'antigene. L'impatto di ciascuno di questi parametri sull'adsorbimento può essere facilmente valutato. Il grado di adsorbimento può essere determinato confrontando la quantità totale di antigene fHBP in una composizione (*ad es.* misurato prima che si verifichi l'adsorbimento o misurato desorbendo l'antigene adsorbito) alla quantità che rimane nel supernatante dopo la centrifugazione (*ad es.* vedi capitolo 4 di rif. 15). L'assenza di antigene rilevabile nel

supernatante dopo la centrifugazione indica che si è verificato un adsorbimento totale *cioè* tutto il fHBP è nel pellet, che contiene l'adiuvante insolubile e il suo contenuto adsorbito.

È noto l'uso di miscele di diversi sali di alluminio in un singolo vaccino *ad es.* vedere riferimento 16. Sebbene adiuvanti comprendenti sia idrossifosfato che idrossido di alluminio possano essere usati con fHBP, si preferisce che una composizione non includa adiuvante di idrossido di alluminio perché, come descritto sopra, esso può degradare alcuni antigeni che possono essere miscelati con l'fHBP (in particolare, saccaridi capsulari batterici coniugati).

In una prima serie di realizzazioni, le proteine fHBP vengono adsorbite in modo efficiente su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio assicurando che l'adsorbimento avvenga ad un pH uguale o inferiore al PZC dell'adiuvante. Quindi un adiuvante può essere scelto con un PZC uguale o superiore a un pH di formulazione desiderato, oppure un pH può essere scelto uguale o inferiore al PZC dell'adiuvante desiderato. Adjuvante e antigene vengono combinati in queste condizioni e si può verificare l'adsorbimento. Il pH non dovrebbe essere così basso da impedire l'adsorbimento o denaturare irreversibilmente l'fHBP. Pertanto l'adsorbimento avviene idealmente entro 2 unità di pH (idealmente entro 1,2 unità di pH) del PZC.

In una seconda serie di realizzazioni, le proteine HBP vengono adsorbite in modo efficiente su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio usando un antigene fHBP di meningococco con un punto isoelettrico tra 5,0 e 7,0 e un adiuvante di idrossifosfato di alluminio con un punto di carica zero anch'esso tra 5,0 e 7,0. L'adsorbimento avviene a un pH compreso tra 5,0 e 7,0 e il pH può essere mantenuto (prima, durante e/o dopo l'adsorbimento) includendo un tampone per mantenere il pH nell'intervallo da 5,0 a 7,0. Nell'intervallo di pH compreso tra 5,0 e 7,0, un sottointervallo preferito è compreso tra 5,0 e 6,0. Questo secondo approccio non è adatto a tutti gli fHBP in quanto alcuni (*ad es.* SEQ. ID. N.: 20) hanno un pI al di fuori dell'intervallo richiesto, ma è possibile selezionare facilmente un fHBP appropriato.

Il punto isoelettrico di un fHBP può essere determinato empiricamente mediante una tecnica come la focalizzazione isoelettrica. Più convenientemente, tuttavia, il punto isoelettrico è un punto isoelettrico teorico. Questo può essere calcolato usando i valori di pKa degli amminoacidi descritti nel riferimento 17 *ad es.* usando

lo strumento ExPASy pertinente [18]. Ad esempio, la sequenza nascente di amminoacidi SEQ. ID. N.: 20 ha un pI previsto di 7,72 mentre SEQ. ID. N.: 21 e 22 hanno pI previsto di 5,87 e 6,15. Sequenze mature SEQ. ID. N.: 23, 24 e 25 (comprendenti SEQ. ID. N.: 4, 5 e 6, rispettivamente) hanno tutte un pI previsto nell'intervallo pertinente: 5,46, 5,72 e 5,86, rispettivamente. Una correzione per un'ammina N-terminale bloccata (*ad es.* quando lipidata) riduce il pI di circa 0,1 ma SEQ. ID. N.: 23, 24 e 25 hanno ancora previsioni di pI nell'intervallo da 5,0 a 6,0. Sono preferite combinazioni in cui ciascun diverso antigene di meningococco fHBP ha una pI tra 5,0 e 7,0, e in particolare quando entrambi hanno un pI nell'intervallo da 5,0 a 6,0 o nell'intervallo da 5,2 a 6,2.

Un'utile combinazione di antigeni fHBP con pI nell'intervallo appropriato può comprendere una miscela di prima e terza sequenza basata su SEQ. ID. N.: 4 e 6 (o loro varianti simili) o una miscela di prima e terza sequenza basata su una miscela di SEQ. ID. N.: 5 e 6 (o loro varianti simili). Ulteriori dettagli su tali abbinamenti di antigeni sono forniti sopra. Ad esempio, una combinazione di SEQ. ID. N.: 23 e 25 è particolarmente utile e queste due proteine possono essere lipidate (come discusso sopra).

In una terza serie di realizzazioni, un antigene fHBP di meningococco con un pI maggiore del PZC di adiuvante di idrossifosfato di alluminio può essere efficacemente adsorbito assicurando che l'adsorbimento avvenga ad un pH entro 1,2 unità di pH dal PZC. L'adsorbimento può avvenire a un pH superiore o inferiore al PZC dell'adiuvante, sebbene il pH non dovrebbe essere così estremo da denaturare irreversibilmente l'fHBP. Il pH durante l'adsorbimento è preferibilmente ottenuto includendo un tampone che mantiene il pH entro 1,2 unità di pH del PZC dell'adiuvante. Quando un pH è compreso tra 1,2 unità di pH, può essere compreso tra 1 unità di pH o meno *ad es.* entro 0,8 unità di pH, entro 0,6 unità di pH, entro o 0,5 unità di pH.

Ordine di miscelazione

La miscelazione di antigene(i) fHBP, idrossifosfato di alluminio e qualsiasi tampone può avvenire in qualsiasi ordine adatto, combinando tutti i componenti separatamente o pre-miscelando due componenti e poi miscelando la pre-miscelazione con il terzo componente.

Pertanto, ad esempio, in una realizzazione un procedimento per preparare una composizione immunogenica può comprendere una fase di combinazione di un antigene fHBP di meningococco e un adiuvante di idrossifosfato di

alluminio, in cui: (i) l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio ha un punto di carica di zero; e (ii) la fase di combinazione si verifica a un pH inferiore al punto di carica zero in modo tale che l'antigene fHBP si adsorba sull'adiuvante.

In un'altra realizzazione, un procedimento per preparare una composizione immunogenica può comprendere una fase di combinazione di un antigene fHBP di meningococco e un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, in cui: (i) l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio ha un punto di carica zero; e (ii) la composizione ha un pH inferiore al punto di carica zero, in modo tale che l'antigene fHBP si adsorba sull'adiuvante.

In un'altra realizzazione, un procedimento per preparare una composizione immunogenica può comprendere fasi di: (i) fornire una composizione acquosa comprendente un antigene fHBP di meningococco e avente un pH; (ii) fornire un adiuvante di idrossifosfato di alluminio avente un punto di carica zero superiore a detto pH; e (iii) combinare la composizione acquosa con l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio per dare la composizione immunogenica.

In un'altra realizzazione, un procedimento per preparare una composizione immunogenica può comprendere fasi di: (i) fornire una composizione acquosa comprendente un adiuvante di idrossifosfato di alluminio e avente un pH, in cui l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio ha un punto di carica zero che è superiore a detto pH; e (ii) combinare la composizione acquosa con un antigene fHBP di meningococco per dare la composizione immunogena.

In un'altra realizzazione, un procedimento per preparare una composizione immunogenica può comprendere i passaggi di: (i) fornire una prima composizione acquosa avente un pH; (ii) fornire una seconda composizione acquosa comprendente un antigene fHBP di meningococco e un adiuvante di idrossifosfato di alluminio avente un punto di carica zero che è superiore a detto pH; e (iii) combinare la prima e la seconda composizione acquosa per dare la composizione immunogenica.

In un'altra realizzazione, un procedimento per preparare una composizione immunogenica può comprendere fasi di: (i) fornire una prima composizione acquosa avente un pH; (ii) fornire una seconda composizione acquosa comprendente un antigene fHBP di meningococco; e (iii) fornire un adiuvante di idrossifosfato di alluminio

avente un punto di carica zero che è superiore a detto pH; e (iv) combinare in qualsiasi ordine la prima composizione acquosa, la seconda composizione acquosa e l'idrossifosfato di alluminio, per dare la composizione immunogenica.

In un metodo per adsorbire due diversi antigeni di meningococco di fHBP su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, l'adsorbimento di entrambi gli antigeni di fHBP può avvenire a un pH uguale o inferiore al punto di carica zero dell'idrossifosfato di alluminio. Ancora una volta, la miscelazione di antigeni fHBP, idrossifosfato di alluminio e un tampone può avvenire in qualsiasi ordine adatto.

Pertanto, in una realizzazione, i due diversi antigeni fHBP vengono adsorbiti separatamente su idrossifosfato di alluminio al pH appropriato, e i due antigeni adsorbiti possono poi essere miscelati.

In un'altra realizzazione, i due diversi antigeni fHBP vengono miscelati tra loro e la miscela viene quindi aggiunta all'idrossifosfato di alluminio, dove l'idrossifosfato di alluminio ha un pH appropriato per l'adsorbimento o dove il pH viene regolato dopo l'aggiunta della miscela.

In un'altra realizzazione, i due diversi antigeni fHBP vengono aggiunti in sequenza all'idrossifosfato di alluminio, dove l'idrossifosfato di alluminio ha un pH appropriato per l'adsorbimento o dove il pH viene regolato dopo l'aggiunta di uno o entrambi gli antigeni fHBP.

In un'altra realizzazione, un antigene fHBP viene miscelato con idrossifosfato di alluminio e quindi l'altro antigene fHBP viene aggiunto alla miscela, in cui l'idrossifosfato di alluminio ha un pH appropriato per l'adsorbimento prima dell'aggiunta del primo antigene fHBP o in cui il pH viene regolato dopo l'aggiunta del primo antigene fHBP o in cui il pH viene regolato prima dell'aggiunta del secondo antigene fHBP o in cui il pH viene regolato dopo l'aggiunta del secondo antigene fHBP.

Queste e altre possibilità sono disponibili al tecnico esperto per tutte le realizzazioni dell'invenzione.

Altri antigeni

Oltre agli antigeni fHBP, le composizioni dell'invenzione possono includere altri antigeni da meningococco o da altri agenti patogeni *ad es.* da altri batteri come pneumococco.

Altri antigeni polipeptidici di meningococco

Oltre a includere antigeni polipeptidici di fHBP di meningococco, una composizione può includere uno o più di altri antigeni polipeptidici di meningococco. Pertanto una composizione può includere un antigene polipeptidico scelto dal gruppo costituito da: 287, NadA, NspA, HmbR, NhhA, App e/o Omp85. Questi antigeni saranno utilmente presenti come polipeptidi purificati *ad es.* polipeptidi ricombinanti. L'antigene susciterà preferibilmente anticorpi anti-meningococco battericidi dopo la somministrazione in un soggetto. Se una composizione include un antigene PorA, in alcune realizzazioni viene incluso solo un sierotipo di PorA di meningococco. In alcune realizzazioni, nessuna proteina di membrana esterna porA di meningococco è inclusa in una composizione.

Una composizione dell'invenzione può includere un antigene 287. L'antigene 287 è stato incluso nella sequenza del genoma pubblicata per il meningococco di sierogruppo B ceppo MC58 [19] come gene NMB2132 (numero di collocazione GenBank GI: 7227388; SEQ. ID. N.: 9 in esso). Le sequenze di antigene 287 da molti ceppi sono state pubblicate da allora. Ad esempio, forme alleliche di 287 possono essere osservate nelle Figure 5 e 15 del riferimento 20, e nell'esempio 13 e nella figura 21 del riferimento 21 (SEQ. ID. da 3179 a 3184 in esso). Sono stati anche descritti vari frammenti immunogenici dell'antigene 287. Antigeni 287 preferiti da usare con l'invenzione comprendono una sequenza di amminoacidi: (a) avente almeno il 50% di identità (*ad es.* 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o più) a SEQ. ID. N.: 9; e/o (b) comprendente un frammento di almeno 'n' amminoacidi consecutivi di SEQ. ID. N.: 9, in cui 'n' è 7 o più (*ad es.* 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o più). Frammenti preferiti di (b) comprendono un epitopo da SEQ. ID. N.: 9. Gli antigeni 287 più utili dell'invenzione possono provocare anticorpi che, dopo la somministrazione a un soggetto, possono legarsi a un polipeptide di meningococco costituito da una sequenza di amminoacidi di SEQ. ID. N.: 9. Antigeni 287 vantaggiosi da usare con l'invenzione possono suscitare anticorpi anti-meningococco battericidi dopo la somministrazione in un soggetto.

Una composizione dell'invenzione può includere un antigene NadA. L'antigene NadA è stato incluso nella sequenza del genoma pubblicata per il meningococco di sierogruppo B ceppo MC58 [19] come gene NMB1994 (numero di collocazione GenBank GI: 7227256; SEQ. ID. N.: 10 nella presente). Le sequenze dell'antigene

NadA di molti ceppi sono state pubblicate da allora e l'attività della proteina come adesina di Neisseria è stata ben documentata. Sono stati anche descritti vari frammenti immunogenici di NadA. Gli antigeni NadA preferiti da usare con l'invenzione comprendono una sequenza di amminoacidi: (a) avente almeno il 50% di identità (*ad es.* 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o più) a SEQ. ID. N.: 10; e/o (b) comprendente un frammento di almeno 'n' amminoacidi consecutivi di SEQ. ID. N.: 10, in cui 'n' è 7 o più (*ad es.* 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o più). Frammenti preferiti di (b) comprendono un epitopo da SEQ. ID. N.: 10. Gli antigeni NadA più utili dell'invenzione possono provocare anticorpi che, dopo la somministrazione a un soggetto, possono legarsi a un polipeptide di meningococco costituito da una sequenza di amminoacidi SEQ. ID. N.: 10. Antigeni NadA vantaggiosi da usare con l'invenzione possono suscitare anticorpi anti-meningococco battericidi dopo la somministrazione in un soggetto. SEQ. ID. N.: 6 è uno di questi frammenti.

Una composizione dell'invenzione può includere un antigene NspA. L'antigene NspA è stato incluso nella sequenza del genoma pubblicata per il meningococco di sierogruppo B ceppo MC58 [19] come gene NMB0663 (numero di collocazione GenBank GI: 7225888; SEQ. ID. N.: 11 nella presente). L'antigene era precedentemente noto dai riferimenti 22 e 23. Le sequenze dell'antigene NspA di molti ceppi sono state pubblicate da allora. Sono stati anche descritti vari frammenti immunogenici di NspA. Gli antigeni NspA preferiti da usare con l'invenzione comprendono una sequenza di amminoacidi: (a) avente almeno il 50% di identità (*ad es.* 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o più) a SEQ. ID. N.: 11; e/o (b) comprendente un frammento di almeno 'n' amminoacidi consecutivi di SEQ. ID. N.: 11, in cui 'n' è 7 o più (*ad es.* 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o più). Frammenti preferiti di (b) comprendono un epitopo da SEQ. ID. N.: 11. Gli antigeni NspA più utili dell'invenzione possono provocare anticorpi che, dopo la somministrazione a un soggetto, possono legarsi a un polipeptide di meningococco costituito da una sequenza di amminoacidi di SEQ. ID. N.: 11. Antigeni NspA vantaggiosi da usare con l'invenzione possono suscitare anticorpi anti-meningococco battericidi dopo la somministrazione ad un soggetto. Le composizioni dell'invenzione possono includere un antigene HmbR di meningococco. La sequenza HmbR a

tutta lunghezza è stata inclusa nella sequenza del genoma pubblicata per il meningococco di sierogruppo B ceppo MC58 [19] come gene NMB1668 (SEQ. ID. N.: 7 nella presente). Il riferimento 24 riporta una sequenza HmbR da un diverso ceppo (SEQ. ID. N.: 8 nella presente). SEQ. ID. N.: 7 e 8 differiscono in lunghezza per 1 amminoacido e hanno un'identità del 94,2%. L'invenzione può usare un polipeptide che comprende una sequenza HmbR a tutta lunghezza, ma utilizzerà spesso un polipeptide che comprende una sequenza HmbR parziale. Pertanto in alcune realizzazioni una sequenza HmbR usata secondo l'invenzione può comprendere una sequenza di amminoacidi avente almeno $i\%$ di identità sequenza a SEQ. ID. N.: 7, dove il valore di i è di 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o più. In altre realizzazioni una sequenza HmbR usata secondo l'invenzione può comprendere almeno un frammento di j amminoacidi consecutivi da SEQ. ID. N.: 7, dove il valore di j è 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o più. In altre realizzazioni una sequenza HmbR usata secondo l'invenzione può comprendere una sequenza amminoacidica (i) avente almeno $i\%$ di identità di sequenza con SEQ. ID. N.: 7 e/o (ii) comprendente almeno un frammento di j amminoacidi consecutivi da SEQ. ID. N.: 7. Frammenti preferiti di j amminoacidi comprendono un epitopo da SEQ. ID. N.: 7. Tali epitopi di solito comprendono amminoacidi che si trovano sulla superficie di HmbR. Gli epitopi utili includono quelli con amminoacidi coinvolti nel legame di HmbR all'emoglobina, poiché gli anticorpi che si legano a questi epitopi possono bloccare la capacità di un batterio di legarsi all'emoglobina dell'ospite. La topologia di HmbR e i suoi residui funzionali critici sono stati studiati nel riferimento 25. Gli antigeni HmbR più utili dell'invenzione possono suscitare anticorpi che, dopo la somministrazione a un soggetto, possono legarsi a un polipeptide di meningococco costituito da una sequenza di amminoacidi SEQ. ID. N.: 7. Antigeni HmbR vantaggiosi per l'uso con l'invenzione possono suscitare anticorpi anti-meningococco battericidi dopo la somministrazione ad un soggetto.

Una composizione dell'invenzione può includere un antigene NhhA. L'antigene NhhA è stato incluso nella sequenza del genoma pubblicata per il meningococco di sierogruppo B ceppo MC58 [19] come gene NMB0992 (numero di collocazione GenBank GI: 7226232; SEQ. ID. N.: 12 nella presente). Le sequenze di antigene NhhA di molti ceppi sono state pubblicate da allora *ad es.* riferimenti 20 e 26, e sono stati riportati vari frammenti

immunogenici di NhhA. Esso è anche noto come Hsf. Gli antigeni NhhA preferiti per l'uso con l'invenzione comprendono una sequenza di amminoacidi: (a) avente almeno il 50% di identità (*ad es.* 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o più) a SEQ. ID. N.: 12; e/o (b) comprendente un frammento di almeno 'n' amminoacidi consecutivi di SEQ. ID. N.: 12, in cui 'n' è 7 o più (*ad es.* 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o più). Frammenti preferiti di (b) comprendono un epitopo da SEQ. ID. N.: 12. Gli antigeni NhhA più utili dell'invenzione possono suscitare anticorpi che, dopo la somministrazione a un soggetto, possono legarsi a un polipeptide di meningococco costituito da una sequenza di amminoacidi SEQ. ID. N.: 12. Antigeni NhhA vantaggiosi per l'uso con l'invenzione possono suscitare anticorpi anti-meningococco battericidi dopo la somministrazione in un soggetto.

Una composizione dell'invenzione può includere un antigene App. L'antigene App è stato incluso nella sequenza del genoma pubblicata per il meningococco di sierogruppo B ceppo MC58 [19] come gene NMB1985 (numero di collocazione GenBank GI: 7227246; SEQ. ID. N.: 13 nella presente). Le sequenze di antigene App di molti ceppi sono state pubblicate da allora. Sono stati anche descritti vari frammenti immunogenici di App. Gli antigeni App preferiti da usare con l'invenzione comprendono una sequenza di amminoacidi: (a) avente almeno il 50% di identità (*ad es.* 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o più) a SEQ. ID. N.: 13; e/o (b) comprendente un frammento di almeno 'n' amminoacidi consecutivi di SEQ. ID. N.: 13, in cui 'n' è 7 o più (*ad es.* 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o più). Frammenti preferiti di (b) comprendono un epitopo da SEQ. ID. N.: 13. Gli antigeni App più utili dell'invenzione possono suscitare anticorpi che, dopo la somministrazione a un soggetto, possono legarsi a un polipeptide di meningococco costituito da una sequenza di amminoacidi SEQ. ID. N.: 13. Antigeni App vantaggiosi da usare con l'invenzione possono suscitare anticorpi anti-meningococco battericidi dopo la somministrazione ad un soggetto.

Una composizione dell'invenzione può includere un antigene Omp85. L'antigene Omp85 è stato incluso nella sequenza del genoma pubblicata per il meningococco di sierogruppo B ceppo MC58 [19] come gene NMB0182 (numero di collocazione GenBank GI: 7225401; SEQ. ID. N.: 14 nella presente). Le sequenze di antigene

Omp85 di molti ceppi sono state pubblicate da allora. Ulteriori informazioni su Omp85 sono disponibili nei riferimenti 27 e 28. Sono stati riportati anche vari frammenti immunogenici di Omp85. Gli antigeni Omp85 preferiti da usare con l'invenzione comprendono una sequenza di amminoacidi: (a) avente almeno il 50% di identità (ad esempio 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o più) a SEQ. ID. N.: 14; e/o (b) comprendente un frammento di almeno 'n' amminoacidi consecutivi di SEQ. ID. N.: 14, in cui 'n' è 7 o più (*ad es.* 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o più). Frammenti preferiti di (b) comprendono un epitopo da SEQ. ID. N.: 14. Gli antigeni Omp85 più utili dell'invenzione possono provocare anticorpi che, dopo la somministrazione a un soggetto, possono legarsi a un polipeptide di meningococco costituito da una sequenza di amminoacidi SEQ. ID. N.: 14. Antigeni Omp85 vantaggiosi da usare con l'invenzione possono suscitare anticorpi anti-meningococco battericidi dopo la somministrazione ad un soggetto.

Lipooligosaccaride di meningococco

Oltre a includere gli antigeni del polipeptide fHBP di meningococco, una composizione può includere uno o più antigeni lipooligosaccaridici (LOS) di meningococco. LOS di meningococco è un fosfolipide a base di glucosamina che si trova nel monostrato esterno della membrana esterna del batterio. Esso include una porzione di lipide A e una regione oligosaccaridica centrale, con la porzione di lipide A che funge da ancoraggio idrofobico nella membrana. L'eterogeneità all'interno del nucleo dell'oligosaccaride genera una diversità strutturale e antigenica tra i diversi ceppi di meningococco, che è stata usata per suddividere i ceppi in 12 immunotipi (da L1 a L12). L'invenzione può usare LOS da qualsiasi immunotipo *ad es.* da L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 e/o L8.

Le catene α L2 e L3 includono naturalmente latto-N-neotetraoso (LNnT). Laddove l'invenzione usa LOS da un immunotipo L2 o L3, questo LNnT può essere assente. Questa assenza può essere raggiunta convenientemente usando ceppi mutanti che sono progettati per perturbare la loro capacità di sintetizzare il tetrasaccaride LNnT all'interno della catena α . È noto che per raggiungere questo obiettivo si può fare ricorso a "knockout" degli enzimi responsabili delle aggiunte biosintetiche rilevanti [29,30]. Ad esempio, il "knockout" dell'enzima LgtB

impedisce l'aggiunta del galattosio terminale di LNnT, oltre a prevenire l'aggiunta a valle dell'acido sialico terminale della catena α . Il "knockout" dell'enzima LgtA impedisce l'aggiunta della N-acetil-glucosamina di LNnT, e anche le aggiunte a valle. Il "knockout" di LgtA può essere accompagnato dal "knockout" di LgtC. Allo stesso modo, il "knockout" dell'enzima LgtE e/o GalE impedisce l'aggiunta di galattosio interno e il "knockout" di LgtF impedisce l'aggiunta di glucosio al residuo Hep^I. Qualsiasi di questi "knockout" può essere usato, singolarmente o in combinazione, per perturbare il tetrasaccaride LNnT in un ceppo di immunotipo L2, L3, L4, L7 o L9. Il "knockout" di almeno LgtB è preferito, in quanto fornisce un LOS che conserva un'immunogenicità utile rimuovendo l'epitopo LNnT.

Oltre a, o al posto di, mutazioni per perturbare l'epitopo LNnT, un "knockout" del gene *galE* fornisce anche un utile LOS modificato, e un gene di lipide A grasso trasferasi può essere eliminato allo stesso modo [31]. Almeno un acido grasso O-legato primario può essere rimosso da LOS [32]. Può anche essere usato LOS avente un numero ridotto di catene aciliche secondarie per molecola LOS [33]. Il LOS includerà tipicamente almeno la struttura di GlcNAc-Hep₂fosfoetanolamina-KDO₂-Lipide A [34]. Il LOS può includere un trisaccaride GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc pur essendo privo del tetrasaccaride LNnT.

LOS può essere incluso in composizioni dell'invenzione in varie forme. Esso può essere usato da solo in forma purificata. Può essere coniugato con una proteina di trasporto. Quando LOS è coniugato, la coniugazione può avvenire attraverso una porzione di lipide A nel LOS o mediante qualsiasi altra porzione adatta *ad es.* i suoi residui KDO. Se la porzione di lipide A di LOS è assente, è necessario tale collegamento alternativo. Le tecniche di coniugazione per LOS sono note *ad es.* dai riferimenti 32, 34, 35, 36, *ecc.* Di seguito vengono discusse utili proteine trasportatrici per questi coniugati *ad es.* tossine batteriche, come le tossine della difterite o del tetano, o loro tossoidi o mutanti.

Il LOS può provenire da un ceppo (*ad es.* un ceppo di meningococco geneticamente modificato che ha un immunotipo LOS fisso (*cioè* non variabile per fase) come descritto nel riferimento 37. Ad esempio, gli immunotipi LOS L2 e L3 possono essere fissati. Tali ceppi possono avere una velocità di commutazione tra immunotipi ridotta di oltre 2 volte (anche >50 volte) rispetto al ceppo di tipo selvatico originale. Il riferimento

37 descrive come questo risultato può essere ottenuto modificando i prodotti genici *lgtA* e/o *lgtG*.

LOS può essere O-acetilato su un residuo GlcNac attaccato al suo residuo di eptosio II ad es. per L3 [38].

Una composizione immunogenica può includere più di un tipo di LOS *ad es.* LOS da immunotipi di meningococco L2 e L3. Ad esempio, possono essere usate le combinazioni di LOS descritte nel riferimento 39.

Un antigene LOS può preferibilmente suscitare anticorpi anti-di meningococco battericidi dopo la somministrazione ad un soggetto.

Tuttavia, le composizioni preferite dell'invenzione sono prive di lipooligosaccaride di meningococco.

Antigene(i) saccaridico capsulare di meningococco

Oltre a includere antigeni del polipeptide fHBP di meningococco, una composizione può includere uno o più coniugati saccaridici capsulari di meningococco. Una composizione dell'invenzione può includere uno o più coniugati di saccaridi capsulari da 1, 2, 3 o 4 di sierogruppi di meningococco A, C, W135 e Y *ad es.* 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, *ecc.* Le composizioni che includono un saccaride capsulare di sierogruppo C coniugato sono utili e le composizioni che comprendono saccaridi di tutti e quattro i sierogruppi A, C, W135 e Y sono ideali.

Il saccaride capsulare del sierogruppo A di meningococco è un omopolimero di *N*-acetil-D-mannosamina-1-fosfato con legame ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilazione parziale nelle posizioni C3 e C4. L'acetilazione nella posizione C-3 può essere del 70-95%. Le condizioni usate per purificare il saccaride possono risultare nella de-O-acetilazione (*ad es.* in condizioni basiche), ma è utile mantenere OAc in questa posizione C-3. In alcune realizzazioni, almeno il 50% (*ad es.* almeno il 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o più) dei residui di mannosammina in saccaridi di un sierogruppo A sono O-acetilati nella posizione C-3. I gruppi acetilici possono essere sostituiti con gruppi bloccanti per prevenire l'idrolisi [40], e tali saccaridi modificati sono ancora saccaridi del sierogruppo A ai sensi dell'invenzione.

Il saccaride capsulare sierogruppo C è un omopolimero di acido sialico legato ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (acido N-acetilneuraminico o "NeuNAc"). La struttura del saccaride è scritta come $\rightarrow 9$ -Neu *p* NAc 7/8 OAc- ($\alpha 2 \rightarrow$). La maggior parte dei ceppi di sierogruppo C hanno gruppi O-acetilici a C-7 e/o C-8 dei residui di acido sialico, ma

circa il 15% degli isolati clinici mancano di questi gruppi O-acetilici [41,42]. La presenza o l'assenza di gruppi OAc genera epitopi unici e la specificità del legame anticorpale al saccaride può influenzare la sua attività battericida contro ceppi O-acetilati (OAc+) e de-O-acetilati (OAc-) [43-45]. I saccaridi del sierogruppo C usati con l'invenzione possono essere preparati da ceppi di OAc+ o OAc-. I vaccini coniugati MenC autorizzati comprendono sia saccaridi OAc- (NEISVAC-C™) sia OAc+ (MENJUGATE™ e MENINGITEC™). In alcune realizzazioni, i ceppi per la produzione di coniugati del sierogruppo C sono ceppi OAc+, *ad es.* del sierosottotipo 16, sierotipo P1.7a, 1, *ecc.* Pertanto possono essere usati ceppi C:16:P1.7a,1 OAc+. Sono utili anche i ceppi OAc+ nel sierosottotipo P1.1, come il ceppo C11.

Il saccaride di sierogruppo W135 è un polimero di unità disaccaridiche di acido sialico-galattosio. Come il saccaride di sierogruppo C, esso ha O-acetilazione variabile, ma nelle posizioni 7 e 9 di acido sialico [46]. La struttura è scritta come: $\rightarrow 4\text{-D-Neup5Ac(7/9OAc)-}\alpha\text{-}(2 \rightarrow 6)\text{-D-Gal-}\alpha\text{-}(1 \rightarrow$.

Il saccaride di sierogruppo Y è simile al saccaride di sierogruppo W135, tranne per il fatto che l'unità ripetitiva disaccaridica include glucosio anziché galattosio. Come il sierogruppo W135, esso ha O-acetilazione variabile nelle posizioni 7 e 9 dell'acido sialico [46]. La struttura del sierogruppo Y è scritta come: $\rightarrow 4\text{-D-Neup5Ac(7/9OAc)-}\alpha\text{-}(2 \rightarrow 6)\text{-D-Glc-}\alpha\text{-}(1 \rightarrow$.

I saccaridi usati secondo l'invenzione possono essere O-acetilati come sopra descritto (*ad es.* con lo stesso modello di O-acetilazione osservato nei saccaridi capsulari nativi), oppure possono essere parzialmente o totalmente de-O-acetilati in una o più posizioni degli anelli di saccaride, oppure possono essere iper-O-acetilati rispetto ai saccaridi capsulari nativi.

Le porzioni di saccaridi nei coniugati possono comprendere saccaridi a tutta lunghezza come preparati da meningococchi, e/o possono comprendere frammenti di saccaridi a tutta lunghezza *cioè* i saccaridi possono essere più corti dei saccaridi capsulari nativi osservati nei batteri. I saccaridi possono quindi essere depolimerizzati, con la depolimerizzazione che si verifica durante o dopo la purificazione del saccaride ma prima della coniugazione. La depolimerizzazione riduce la lunghezza della catena saccaridica. Un metodo di depolimerizzazione prevede l'uso di perossido di idrogeno. Il perossido di idrogeno viene aggiunto a un

saccaride (*ad es.* per dare una concentrazione finale di H₂O₂ dell'1%) e la miscela viene poi incubata (*ad es.* a circa 55°C) fino al raggiungimento della riduzione desiderata della lunghezza della catena. Un altro metodo di depolimerizzazione prevede l'idrolisi acida. Altri metodi di depolimerizzazione sono noti nella tecnica. I saccaridi usati per preparare coniugati per l'uso secondo l'invenzione possono essere ottenibili con uno qualsiasi di questi metodi di depolimerizzazione. La depolimerizzazione può essere usata per fornire una lunghezza della catena ottimale per l'immunogenicità e/o per ridurre la lunghezza della catena per la gestibilità fisica dei saccaridi. In alcune realizzazioni, i saccaridi hanno il seguente intervallo di gradi medi di polimerizzazione (Dp): A = 10-20; C = 12-22; W135 = 15-25; Y = 15-25. In termini di peso molecolare, piuttosto che Dp, gli intervalli utili sono, per tutti i sierogruppi: <100kDa; 5kDa-75kDa; 7kDa-50kDa; 8kDa-35kDa; 12kDa-25kDa; 15kDa-22kDa.

In alcune realizzazioni, il peso molecolare medio dei saccaridi di ciascuno dei sierogruppi di meningococco A, C, W135 e Y può essere superiore a 50kDa *ad es.* ≥75kDa, ≥100kDa, ≥110kDa, ≥120kDa, ≥130kDa, *ecc.* [47] e persino fino a 1500kDa, in particolare come determinato mediante MALLS. Ad esempio: un saccaride MenA può essere compreso nell'intervallo 50-500kDa *ad es.* 60-80kDa; un saccaride MenC può essere compreso nell'intervallo di 100-210 kDa; un saccaride MenW135 può essere compreso tra 60 e 190 kDa *ad es.* 120-140kDa; e/o un saccaride MenY può essere compreso nell'intervallo di 60-190 kDa *ad es.* 150-160kDa.

La massa di saccaride di meningococco per sierogruppo in una composizione sarà generalmente compresa tra 1 µg e 20 µg *ad es.* tra 2 e 10 µg per sierogruppo, o circa 4 µg o circa 5 µg o circa 10 µg. Dove sono inclusi coniugati di più di un sierogruppo, essi possono essere presenti a masse sostanzialmente uguali *ad es.* la massa del saccaride di ciascun sierogruppo è compresa entro +10% l'una dall'altra. In alternativa a un rapporto uguale, può essere usata una doppia massa di saccaride di sierogruppo A. Pertanto un vaccino può includere saccaride MenA a 10 µg e saccaridi MenC, W135 e Y a 5 µg ciascuno.

Proteine trasportatrici utili per i coniugati di meningococco includono tossine batteriche, come le tossine della difterite o del tetano, o loro tossoidi o mutanti. Questi sono comunemente usati nei vaccini coniugati. Ad esempio, il mutante della tossina difterica CRM197 è utile [48]. Altre proteine di trasporto adatte includono

peptidi sintetici [49,50], proteine di shock termico [51,52], proteine della pertosse [53,54], citochine [55], linfochine [55], ormoni [55], fattori di crescita [55], proteine artificiali comprendenti più epitopi di cellule T CD4+ umane di vari antigeni derivati da patogeni [56] come N19 [57], proteina D di *H.influenzae* [58-60], pneumolisina [61] o suoi derivati non tossici [62], proteina di superficie pneumococcica PspA [63], proteine di assorbimento del ferro [64], tossina A o B da *C.difficile* [65], esoproteina A da *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) [66], ecc. È preferito CRM197.

Dove una composizione comprende coniugati di più di un sierogruppo di meningococco, è possibile usare la stessa proteina trasportatrice per ciascun coniugato separato o usare proteine trasportatrici diverse. In entrambi i casi, tuttavia, di solito si formerà una miscela di coniugati diversi preparando ciascun coniugato di sierotipo separatamente, e poi mescolandoli per formare una miscela di coniugati separati.

Si possono usare coniugati con un rapporto saccaride:proteina (p/p) compreso tra 1:5 (cioè eccesso di proteine) e 5:1 (cioè eccesso di saccaride) *ad es.* rapporti tra 1:2 e 5:1 e rapporti tra 1:1,25 e 1:2,5. Come descritto nel riferimento 67, coniugati di sierogruppi di meningococco differenti in una miscela possono avere rapporti saccaride:proteina differenti *ad es.* uno può avere un rapporto tra 1:2 e 1:5, mentre un altro ha un rapporto tra 5:1 e 1:1,99.

Una proteina trasportatrice può essere coniugata in modo covalente a un saccaride di meningococco direttamente o tramite un associatore. Sono noti vari associatori. Ad esempio, l'attacco può avvenire tramite un carbonile, che può essere formato per reazione di un gruppo ossidrilico libero di un saccaride modificato con CDI [68,69] seguito da reazione con una proteina per formare un legame carbammato. Si può usare la condensazione di carbodiimmide [70]. È possibile usare un associatore di acido adipico, che può essere formato accoppiando un gruppo -NH₂ libero (*ad es.* introdotto in un saccaride per amminazione) con acido adipico (usando, ad esempio, l'attivazione con diimmide), e poi accoppiando una proteina all'intermedio di saccaride-acido adipico risultante [71,72]. Altri associatori includono β-propionammide [73], nitrofenil-etilammina [74], alogenoacil-alogenuri [75], legami glicosidici [76], acido 6-amminocaproico [77], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [78], acido adipico diidrazide ADH [79], porzioni da C₄ a C₁₂ [80], ecc.

È possibile usare la coniugazione tramite amminazione riduttiva. Il saccaride può essere dapprima ossidato con periodato per introdurre un gruppo aldeidico, che può quindi formare un legame covalente diretto con una proteina trasportatrice mediante amminazione riduttiva *ad es.* al gruppo ϵ -amminico di una lisina. Se il saccaride include più gruppi aldeidici per molecola, allora questa tecnica di collegamento può portare a un prodotto reticolato, in cui più aldeidi reagiscono con più ammine veicolanti.

Come descritto nel riferimento 81, una miscela può includere un coniugato con legame diretto saccaride/proteina e un altro coniugato con collegamento tramite un associatore. Questa disposizione si applica in particolare quando si usano coniugati di saccaride da sierogruppi di meningococco differenti *ad es.* i saccaridi MenA e MenC possono essere coniugati tramite un associatore, mentre i saccaridi MenW135 e MenY possono essere coniugati direttamente a una proteina trasportatrice.

Un saccaride di meningococco può comprendere un saccaride intatto a tutta lunghezza come preparato da meningococco e/o può comprendere frammenti di saccaridi a tutta lunghezza *cioè* i saccaridi possono essere più corti dei saccaridi capsulari nativi osservati nei batteri. I saccaridi possono quindi essere depolimerizzati, con depolimerizzazione che si verifica durante o dopo la purificazione del saccaride ma prima della coniugazione. La depolimerizzazione riduce la lunghezza della catena dei saccaridi. La depolimerizzazione può essere usata per fornire una lunghezza della catena ottimale per l'immunogenicità e/o per ridurre la lunghezza della catena per la gestibilità fisica dei saccaridi.

Saccaride(i) capsulare di pneumococco coniugato

Le composizioni dell'invenzione possono includere un saccaride capsulare di pneumococco coniugato con una proteina trasportatrice.

L'invenzione può includere saccaride capsulare da uno o più sierotipi di pneumococco diversi. Dove una composizione include antigeni saccaridici di più di un sierotipo, questi sono preferibilmente preparati separatamente, coniugati separatamente e poi combinati. I metodi per purificare i saccaridi capsulari di pneumococco sono noti nella tecnica (*ad es.* vedi riferimento 82) e vaccini a base di saccaridi purificati da 23 diversi sierotipi sono noti da molti anni. Sono stati anche descritti miglioramenti a questi metodi *ad es.* per il

sierotipo 3 come descritto nel riferimento 83 o per i sierotipi 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F e 19A come descritto nel riferimento 84.

Il saccaride(i) capsulare di pneumococco sarà/saranno tipicamente scelto(i) dai seguenti sierotipi: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e/o 33F. Quindi, in totale, una composizione può includere un saccaride capsulare da 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o più sierotipi diversi.

Un'utile combinazione di sierotipi è una combinazione 7-valente *ad es.* comprendente il saccaride capsulare da ciascuno dei sierotipi 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Un'altra combinazione utile è una combinazione 9-valente *ad es.* comprendente saccaride capsulare da ciascuno dei sierotipi 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Un'altra combinazione utile è una combinazione 10-valente *ad es.* comprendente saccaride capsulare da ciascuno dei sierotipi 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Una combinazione 11-valente può inoltre includere saccaride dal sierotipo 3. Una combinazione 12-valente può aggiungere alla miscela 10-valente: sierotipi 6A e 19A; 6A e 22F; 19A e 22F; 6A e 15B; 19A e 15B; o 22F e 15B. Una combinazione 13-valente può aggiungere alla miscela 11-valente: sierotipi 19A e 22F; 8 e 12F; 8 e 15B; 8 e 19A; 8 e 22F; 12F e 15B; 12F e 19A; 12F e 22F; 15B e 19A; 15B e 22F; 6A e 19A, *ecc.*

Pertanto, un'utile combinazione 13-valente comprende saccaride capsulare dai sierotipi 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19, 19F e 23F *ad es.* preparati come descritto nei riferimenti da 85 a 88. Una di queste combinazioni include saccaride di sierotipo 6B a circa 8 µg/ml e gli altri 12 saccaridi a concentrazioni di circa 4 µg/ml ciascuno. Un'altra combinazione di questo tipo comprende saccaridi di sierotipo 6A e 6B a circa 8 µg/ml ciascuno e gli altri 11 saccaridi a circa 4 µg/ml ciascuno.

Proteine trasportatrici adatte per i coniugati sono discusse sopra in relazione ai coniugati di meningococco. Le proteine veicolanti particolarmente utili per i vaccini di pneumococco coniugati sono CRM197, tossoide del tetano, tossoide difterico e la proteina D di *H. influenzae*. CRM197 viene usata in PREVNAR™. Una miscela 13-valente può usare CRM197 come proteina veicolante per ciascuno dei 13 coniugati, e CRM197 può essere presente a circa 55-60 µg/ml.

Dove una composizione include coniugati da più di un sierotipo di pneumococco, è possibile usare la stessa proteina trasportatrice per ciascun coniugato separato, o usare proteine trasportatrici diverse. In entrambi i casi, tuttavia, di solito si formerà una miscela di coniugati diversi preparando ciascun coniugato di sierotipo separatamente e poi mescolandoli per formare una miscela di coniugati separati. Il riferimento 89 descrive i potenziali vantaggi quando si usano proteine veicolanti diverse nei vaccini polivalenti coniugati di pneumococco, ma il prodotto PREVNAR™ usa con successo lo stesso vettore per ciascuno dei sette sierotipi differenti.

Una proteina trasportatrice può essere coniugata covalentemente a un saccaride di pneumococco direttamente o tramite un associatore, come discusso sopra in relazione ai coniugati di meningococco. Le tecniche di coniugazione per reticolazione sono particolarmente utili per almeno i sierotipi di pneumococco 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F.

Come discusso sopra per i saccaridi di meningococco, un saccaride di pneumococco può comprendere un saccaride intatto a tutta lunghezza come preparato da pneumococco, e/o può comprendere frammenti di saccaridi a tutta lunghezza. Dove viene usato più di un sierotipo di pneumococco, è possibile usare saccaridi intatti per ciascun sierotipo, frammenti per ciascun sierotipo o usare saccaridi intatti per alcuni sierotipi e frammenti per altri sierotipi. Dove una composizione include saccaride di uno qualsiasi dei sierotipi 4, 6B, 9V, 14, 19F e 23F, questi saccaridi sono preferibilmente intatti. Al contrario, dove una composizione include sierotipo 18C il saccaride è preferibilmente depolimerizzato.

Un saccaride di sierotipo 3 può anche essere depolimerizzato, ad esempio un saccaride di sierotipo 3 può essere sottoposto a idrolisi acida per depolimerizzazione [85] *ad es.* usando acido acetico. I frammenti risultanti possono quindi essere ossidati per attivazione (*ad es.* ossidazione con periodato, eventualmente in presenza di cationi bivalenti *ad es.* con $MgCl_2$), coniugati a un vettore (*ad es.* CRM197) in condizioni riducenti (*ad es.* usando cianoboridruro di sodio) e poi (opzionalmente) qualsiasi aldeide non reagita nel saccaride può essere incappucciata (*ad es.* usando boroidruro di sodio) [85]. La coniugazione può essere eseguita su materiale liofilizzato *ad es.* dopo co-liofilizzazione di saccaride attivato e vettore.

Un saccaride di sierotipo 1 può essere almeno parzialmente de-O-acetilato *ad es.* ottenuto mediante trattamento con tampone a pH alcalino [86], ad esempio usando un tampone di bicarbonato/carbonato. Tali saccaridi (parzialmente) de-O-acetilati possono essere ossidati per l'attivazione (*ad es.* ossidazione con periodato), coniugati a un trasportatore (*ad es.* CRM197) in condizioni di riduzione (*ad es.* usando cianoboroidruro di sodio) e poi (opzionalmente) qualsiasi aldeide non reagita nel saccaride può essere incappucciata (*ad es.* usando boroidruro di sodio) [86]. La coniugazione può essere eseguita su materiale liofilizzato *ad es.* dopo co-liofilizzazione di saccaride attivato e vettore.

Un saccaride di sierotipo 19A può essere ossidato per l'attivazione (*ad es.* ossidazione con periodato), coniugato a un veicolo (*ad es.* CRM197) in DMSO in condizioni riducenti e poi (opzionalmente) qualsiasi aldeide non reagita nel saccaride può essere incappucciata (*ad es.* usando boroidruro di sodio) [90]. La coniugazione può essere eseguita su materiale liofilizzato *ad es.* dopo co-liofilizzazione di saccaride attivato e vettore.

I coniugati di pneumococco possono idealmente suscitare anticorpi anti-capsulari che si legano al saccaride rilevante *ad es.* suscitano un livello di anticorpi anti-saccaride di $\geq 0,20\mu\text{g/mL}$ [91]. Gli anticorpi possono essere valutati mediante saggio immunoenzimatico (EIA) e/o misurazione dell'attività opsonofagocitica (OPA). Il metodo EIA è stato ampiamente validato e esiste un legame tra la concentrazione di anticorpi e l'efficacia del vaccino.

Altri antigeni da altri agenti patogeni

Le composizioni dell'invenzione possono includere antigene(i) da altro agente(i) patogeno. L'uso di un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, e l'evitamento di un adiuvante di idrossido di alluminio è vantaggioso nel contesto di tali combinazioni perché, come sopra descritto, gli antigeni aggiuntivi (in particolare i saccaridi capsulari batterici) possono essere sensibili al sale di idrossido.

Ad esempio, la composizione può comprendere uno o più dei seguenti ulteriori antigeni:

- un antigene del virus dell'epatite B, come l'antigene di superficie HBsAg.
- un antigene di *Bordetella pertussis*, come la otossina di pertosse (PT) e l'emagglutinina filamentosa (FHA) da *B. pertussis*, opzionalmente anche in combinazione con pertactina e/o agglutinogeni 2 e 3.

- un antigene difterico, come un tossoide difterico.
- un antigene del tetano, come un tossoide del tetano.
- un antigene saccaridico di *Haemophilus influenzae* B (Hib), tipicamente coniugato.
- antigene(i) di poliovirus inattivato.

Dove un antigene difterico è incluso nella composizione, si preferisce includere anche antigene del tetano e antigeni di pertosse. Analogamente, dove è incluso un antigene del tetano, è preferibile includere anche antigeni di difterite e pertosse. Allo stesso modo, dove è incluso un antigene di pertosse, si preferisce anche includere antigeni di difterite e tetano. Le combinazioni DTP sono quindi preferite.

Preparazione estemporanea

Noi descriviamo anche un kit comprendente: (i) un primo componente comprendente almeno un antigene fHBP adsorbito su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, come descritto sopra; e (ii) un secondo componente comprendente un immunogeno non di meningococco. I componenti del kit possono essere miscelati per dare una composizione immunogenica da somministrare a un paziente per proteggere da più agenti patogeni.

Noi descriviamo anche un metodo per preparare un vaccino combinato, comprendente un passaggio di miscelazione di: (i) un primo componente comprendente almeno un antigene fHBP adsorbito su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio, come descritto sopra; e (ii) un secondo componente comprendente un immunogeno non di meningococco. Il materiale miscelato può poi essere somministrato a un paziente. Il secondo componente può essere liofilizzato, in modo tale che un primo componente acquoso lo ricostituisca.

Composizioni farmaceutiche

L'invenzione riguarda composizioni immunogeniche per la somministrazione ad un paziente. Queste composizioni sono accettabili farmaceuticamente e includeranno tipicamente un veicolo adatto. Una discussione approfondita di veicoli accettabili farmaceuticamente è disponibile nel riferimento 92.

È possibile stabilire abitualmente volumi di dosaggio efficaci, ma una dose umana tipica della composizione ha un volume di circa 0,5 ml.

Il pH di una composizione dell'invenzione è generalmente compreso tra 6 e 8, e più preferibilmente tra 6,5 e 7,5

(*ad es.* circa 7). Come già discusso in precedenza, le composizioni possono includere un tampone *ad es.* un tampone Tris, un tampone citrato, un tampone fosfato, un tampone succinato (come un tampone succinato di sodio) o un tampone di istidina.

Un particolare pH può essere usato prima e/o durante l'adsorbimento, come spiegato sopra. Se l'adsorbimento è stabile, tuttavia, non è necessario mantenere il pH dopo l'adsorbimento, ma può essere lasciato salire *ad es.* più vicino a neutralità. Dopo l'adsorbimento, quindi, tale composizione può essere tamponata a un pH superiore al PZC dell'adiuvante.

Il pH di una composizione può essere compreso tra 5,0 e 7,0 prima e/o durante l'adsorbimento, ma può essere al di fuori di questo intervallo (*ad es.* nell'intervallo da 7,0 a 8,0) dopo l'adsorbimento. Idealmente, tuttavia, tali composizioni vengono mantenute con un pH post-adsorbimento nell'intervallo da 5,0 a 7,0 mediante l'uso di un tampone.

Se l'adsorbimento ha avuto luogo a un pH superiore al PZC dell'adiuvante, quindi, se l'adsorbimento è stabile, il pH non deve essere mantenuto ma può essere lasciato scendere *ad es.* più vicino alla neutralità. Dopo l'adsorbimento, quindi, tale composizione può essere tamponata a un pH inferiore al PZC dell'adiuvante.

Il pH di una composizione può essere all'interno di 1,2 unità di pH dal PZC dell'adiuvante prima e/o durante l'adsorbimento, ma può essere al di fuori di questo intervallo dopo l'adsorbimento. Idealmente, tuttavia, tali composizioni vengono mantenute con un pH post-adsorbimento entro 1,2 unità di pH dal PZC dell'adiuvante.

In alcune realizzazioni, una composizione dell'invenzione include un tampone con un pKa tra 3,5 e 6,5, in particolare se usato in combinazione con soluzione salina. Nel riferimento 93 si afferma che questa formulazione sia utile con fHBP. Un tampone succinato con succinato 1-10mM (*ad es.* 5mM) è utile, con un pH tra 5,8 e 6,0.

La composizione può includere MgCl₂, KCl e/o NaCl.

La composizione può essere sterile e/o priva di pirogeni. Le composizioni dell'invenzione possono essere isotoniche rispetto all'uomo.

Le composizioni dell'invenzione possono includere sali di sodio (*ad es.* cloruro di sodio) per dare tonicità. È tipica una concentrazione di 10 ± 2 mg/ml di NaCl *ad es.* circa 9 mg/ml.

Le composizioni dell'invenzione per la somministrazione ai pazienti sono immunogeniche e sono preferibilmente composizioni di vaccino. I vaccini secondo l'invenzione possono essere profilattici (*cioè* per prevenire l'infezione) o terapeutici (*cioè* per trattare l'infezione), ma saranno in genere profilattici. Le composizioni immunogeniche usate come vaccini comprendono una quantità immunologicamente efficace di antigene, così come qualsiasi altro componente, se necessario. Per "quantità immunologicamente efficace", si intende che la somministrazione di tale quantità a un individuo, in una singola dose o come parte di una serie, è efficace per il trattamento o la prevenzione. Tale quantità varia a seconda della salute e delle condizioni fisiche dell'individuo da trattare, dell'età, del gruppo tassonomico dell'individuo da trattare (*ad es.* primate non umano, primate, *ecc.*), la capacità del sistema immunitario dell'individuo di sintetizzare gli anticorpi, il grado di protezione desiderato, la formulazione del vaccino, la valutazione del medico curante sulla situazione medica, e altri fattori rilevanti. Si prevede che la quantità ricadrà in un intervallo relativamente ampio che può essere determinato attraverso prove di routine. Il contenuto di antigene delle composizioni dell'invenzione sarà generalmente espresso in termini di quantità di proteina per dose.

I meningococchi colpiscono varie aree del corpo e quindi le composizioni dell'invenzione possono essere preparate in varie forme liquide. Ad esempio, le composizioni possono essere preparate come iniettabili, come soluzioni o sospensioni. La composizione può essere preparata per la somministrazione polmonare ad es. mediante un inalatore, usando uno spray fine. La composizione può essere preparata per la somministrazione nasale, auricolare o oculare *ad es.* come spray o gocce. Gli iniettabili per la somministrazione intramuscolare sono i più tipici.

Le composizioni dell'invenzione possono includere un antimicrobico, in particolare se confezionate in formato a dose multipla. Gli antimicrobici come tiomersale e 2-fenossietanolo si trovano comunemente nei vaccini, ma si preferisce usare un conservante senza mercurio o nessun conservante.

Le composizioni dell'invenzione possono comprendere detergente *ad es.* un Tween (polisorbato), come Tween 80. I detergenti sono generalmente presenti a bassi livelli *ad es.* <0,01%, ma è stato suggerito che livelli più alti stabilizzano le formulazioni di antigene [93] *ad es.* fino a 10%. Una composizione di esempio può includere

dallo 0,01 allo 0,05% di polisorbato, e ciò è particolarmente utile quando si usa antigene(i) fHBP lipidato.

Metodi di trattamento

Le composizioni dell'invenzione possono essere usate in un metodo per suscitare una risposta immunitaria in un mammifero, comprendente la somministrazione di una composizione dell'invenzione al mammifero. La risposta immunitaria è preferibilmente protettiva contro il meningococco e preferibilmente coinvolge anticorpi. Il metodo può suscitare una risposta di richiamo in un paziente che è già stato sensibilizzato.

Il mammifero è preferibilmente un essere umano. Dove il vaccino è per uso profilattico, l'essere umano è preferibilmente un bambino (*ad es.* un bambino piccolo o un neonato) o un adolescente; dove il vaccino è per uso terapeutico, l'essere umano è preferibilmente un adulto. Un vaccino destinato ai bambini può anche essere somministrato agli adulti *ad es.* per valutare sicurezza, dosaggio, immunogenicità, *ecc.*

Le composizioni dell'invenzione sono descritte per l'uso come medicamento. Il medicamento viene preferibilmente usato, come descritto sopra, per suscitare una risposta immunitaria in un mammifero (*cioè* è una composizione immunogenica) ed è più preferibilmente un vaccino.

Noi descriviamo anche l'uso di almeno un antigene fHBP e un adiuvante di idrossifosfato di alluminio nella fabbricazione di un medicinale per suscitare una risposta immunitaria, come descritto sopra, in un mammifero.

Questi usi e metodi sono preferibilmente per la prevenzione e/o il trattamento di una malattia causata da *N. meningitidis ad es.* meningite batterica (o più specificamente di meningococco), o setticemia.

Un modo per verificare l'efficacia del trattamento terapeutico consiste nel monitorare l'infezione da meningococco dopo la somministrazione della composizione dell'invenzione. Un modo per verificare l'efficacia del trattamento profilattico consiste nel monitorare le risposte immunitarie contro gli antigeni dopo la somministrazione della composizione. L'immunogenicità delle composizioni dell'invenzione può essere determinata somministrandole a soggetti di prova (*ad es.* bambini di età compresa tra 12 e 16 mesi o modelli animali) e poi determinando i parametri standard inclusi gli anticorpi battericidi sierici (SBA) e i titoli ELISA (GMT) per il meningococco. Queste risposte immunitarie saranno generalmente determinate circa 4 settimane dopo la somministrazione della composizione e confrontate con i valori determinati prima della

somministrazione della composizione. È preferito un aumento di SBA di almeno 4 volte o 8 volte. Dove viene somministrata più di una dose della composizione, è possibile effettuare più di una determinazione post-somministrazione.

Le composizioni dell'invenzione verranno generalmente somministrate direttamente a un paziente. La somministrazione diretta può essere effettuata mediante iniezione parenterale (*ad es.* per via sottocutanea, intraperitoneale, endovenosa, intramuscolare o nello spazio interstiziale di un tessuto) o mediante qualsiasi altra via adatta. L'invenzione può essere usata per suscitare immunità sistemica e/o mucosa. Si preferisce la somministrazione intramuscolare nella coscia o nella parte superiore del braccio. L'iniezione può avvenire tramite un ago (*ad es.* un ago ipodermico), ma in alternativa può essere usata l'iniezione senza ago. Una dose intramuscolare tipica è di 0,5 ml.

Il trattamento posologico può essere un programma a dose singola o un programma a dosi multiple. Dosi multiple possono essere usate in un programma di immunizzazione primaria e/o in un programma di immunizzazione di richiamo. Un programma di dose primaria può essere seguito da un programma di dosi di richiamo. La temporizzazione adatta tra le dosi di sensibilizzazione (*ad es.* tra 4-16 settimane), e tra sensibilizzazione e richiamo, può essere determinata con metodi di routine.

Generalità

La pratica della presente invenzione impiegherà, se non diversamente indicato, metodi convenzionali di chimica, biochimica, biologia molecolare, immunologia e farmacologia, nell'ambito dell'esperienza nella tecnica. Tali tecniche sono spiegate completamente in letteratura. Vedere, *ad es.*, riferimenti 94-100, *ecc.*

Il termine "comprendente" copre "incluso" oltre a "consistente" *ad es.* una composizione "comprendente" X può consistere esclusivamente di X o può includere qualcosa di aggiuntivo *ad es.* X + Y.

Il termine "circa" in relazione a un valore numerico x è opzionale e significa, ad esempio, $x \pm 10\%$.

Dove l'invenzione riguarda un "epitopo", questo epitopo può essere un epitopo di cellule B e/o un epitopo di cellule T, ma di solito sarà un epitopo di cellule B. Tali epitopi possono essere identificati empiricamente (*ad es.* usando PEPSCAN [101, 102] o metodi simili), oppure possono essere previsti (*ad es.* usando l'indice antigenico

di Jameson-Wolf [103], approcci basati su matrice [104], MAPITOPE [105], TEPITOPE [106, 107], reti neurali [108], OptiMer & EpiMer [109, 110], ADEPT [111], Tsites [112], idrofilia [113], indice antigenico [114] o metodi descritti nei riferimenti 115-119, *ecc.*). Gli epitopi sono le parti di un antigene che sono riconosciute e si legano ai siti di legame dell'antigene di anticorpi o recettori delle cellule T, e possono anche essere definiti "determinanti antigenici".

Dove l'invenzione usa un antigene "purificato", questo antigene viene separato dal suo ambiente naturale. Ad esempio, l'antigene sarà sostanzialmente privo di altri componenti di meningococco, oltre a qualsiasi altro antigene purificato presente. Una miscela di antigeni purificati verrà tipicamente preparata purificando ciascun antigene separatamente e poi ricombinandoli, anche se i due antigeni sono naturalmente presenti in miscela.

I riferimenti a un'identità di sequenza percentuale tra due sequenze di amminoacidi significano che, quando allineate, tale percentuale di amminoacidi è la stessa nel confrontare le due sequenze. Questo allineamento e l'omologia percentuale o l'identità della sequenza possono essere determinati usando programmi software noti nella tecnica, ad esempio quelli descritti nella sezione 7.7.18 di rif. 120. Un allineamento preferito è determinato dall'algoritmo di ricerca per omologia di Smith-Waterman usando una ricerca di lacuna affine con una penalità di apertura di lacuna di 12 e una penalità di estensione di lacuna di 2, matrice BLOSUM di 62. L'algoritmo di ricerca di omologia di Smith-Waterman è descritto in rif. 121.

La parola "sostanzialmente" non esclude "completamente" *ad es.* una composizione che è "sostanzialmente priva" di Y può essere completamente priva di Y. Dove necessario, la parola "sostanzialmente" può essere omessa dalla definizione dell'invenzione.

MODALITÀ PER PRATICARE L'INVENZIONE

Coadiuvanti di alluminio

È stato studiato l'adsorbimento di fHBP su adiuvanti di alluminio differenti in diverse condizioni. Sono stati usati vari antigeni fHBP, incluso un singolo fHBP (pI previsto di 7,4) o miscele ibride di 2 o 3 fHBP. Alcuni esperimenti includevano antigeni di meningococco non-fHBP addizionali.

Con un adiuvante di idrossido di alluminio a pH 6,5 + 0,5, è stato osservato un adsorbimento del 100% di fHBP

con tutti gli antigeni singoli e miscelati. È stato anche osservato un adsorbimento completo a pH leggermente più elevato in presenza di tampone di istidina 10mM. La presenza di adiuvanti polipeptidici di meningococco addizionali non ha ridotto il grado di adsorbimento di fHBP.

Al contrario, con un adiuvante di idrossifosfato di alluminio a pH 7,0 si è visto che l'antigene fHBP era adsorbito solo al 50%. Questo pH è inferiore al pI previsto dell'antigene e al di sopra del PZC dell'adiuvante.

I coadiuvanti di idrossido di alluminio hanno generalmente un PZC di circa 11,4. Pertanto il pH neutro è inferiore al PZC dell'adiuvante. Al contrario, il pH neutro è superiore a PZC dell'adiuvante di idrossifosfato di alluminio.

L'adsorbimento di fHBP su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio è stato studiato a vari pH. I seguenti dati mostrano i dati di pH e adsorbimento ottenuti 24 ore dopo la formulazione. Queste tre formulazioni hanno la stessa concentrazione di proteine (50 µg/ml) e concentrazione di adiuvante (0,5 mg/ml), ma usano un tampone fosfato di sodio 10mM a pH diverso:

pH	% adsorbimento
7,0	~ 50%
5,8	~ 95%
3,5	non adsorbito

Pertanto, adsorbimento di ~ 95% è stato ottenuto in una composizione a pH 5,8. Questo pH è approssimativamente uguale al PZC dell'adiuvante (leggermente più alto) ma è ben al di sotto del pI dell'antigene. Al contrario, ad un pH aumentato (1,2 unità di pH più alto) o pH diminuito (2,3 unità di pH più basso) l'adsorbimento era scarso.

Un alto livello di adsorbimento poteva anche essere ottenuto aumentando la quantità di adiuvante di 4,5 volte.

L'influenza del tampone e del pH è stata studiata in ulteriori esperimenti usando 1 mg/ml di adiuvante e 100 µg/ml di antigene. I risultati erano i seguenti:

Tampone	pH	% adsorbimento
Sodio fosfato 10mM	7,1	~ 80%
	5,9	~ 95%
	5,5	~ 95%
	4	~ 80%
Sodio fosfato 5mM	6,9	~ 85%
	6,1	~ 95%
	5,9	~ 95%
Istidina 5mM	7	~ 96%
	5,9	~ 98%
	5,2	~ 95%

Così era possibile ottenere un elevato adsorbimento ($\geq 95\%$) su idrossifosfato di alluminio selezionando un pH appropriato. Livelli di adsorbimento superiori all'85% sono stati osservati qui solo quando il pH era compreso tra 1,2 unità di pH dal PZC dell'adiuvante (nel relativo tampone).

Come menzionato sopra, questi studi sono stati condotti con un fHBP avente un pI di 7,4. Questo fHBP è indicato di seguito come fHBP-v1. Ulteriori studi sono stati condotti con fHBP da altri due ceppi di meningococco. Il pI previsto per fHBP-v2 è 5,8 e per fHBP-v3 è 6,1. Inoltre, è stata studiata una fusione per combinare tutti e tre v1, v2 e v3. Ognuna di queste quattro proteine è stata formulata a 100 $\mu\text{g/ml}$ con 0,222 mg/ml di adiuvante e 9 mg/ml di NaCl. Sono stati studiati tre diversi pH di formulazione, cioè pH 5, pH 6 e pH 7. È stato poi determinato il grado di adsorbimento delle proteine fHBP sull'idrossifosfato di alluminio. I risultati erano i seguenti:

		Adsorbimento a pH		
	<i>pI</i>	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%

Questi risultati confermano che la combinazione v1/v2/v3, che include un fHBP con un pI di 5,8 e un altro con un pI di 6,1 (cioè entrambi tra 5,0 e 7,0), poteva raggiungere livelli di adsorbimento $\geq 85\%$ usando un adiuvante di idrossifosfato di alluminio con un PZC tra 5,0 e 7,0. Inoltre, i livelli più alti di adsorbimento per questa combinazione sono stati osservati quando il pH era entro 1,2 unità di pH dal punto di carica zero dell'adiuvante (cioè a pH 5 o pH 6, anziché a pH 7).

È stato osservato un elevato adsorbimento tranne che (i) per v1 e v2, quando il pH era superiore di oltre 1,2 unità rispetto al PZC dell'adiuvante (ii) per v1, quando il pH era inferiore al PZC dell'adiuvante e il pI dell'fHBP era al di fuori dell'intervallo di 5,0 fino a 7,0. L'adsorbimento relativamente basso del v2 fHBP a pH 7 poteva essere superato aggiungendo un secondo fHBP con un pI nell'intervallo tra 5,0 e 7,0.

Quindi miscele di varianti multiple di fHBP con valori di pI differenti possono essere formulate con successo con alti livelli di adsorbimento senza richiedere idrossido di alluminio.

Si comprenderà che l'invenzione è stata descritta solo a scopo illustrativo e possono essere apportate modifiche pur rimanendo nel campo dell'invenzione

RIFERIMENTI

[1] Masignani 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] Brevetto U.S.A. 7.404.960.
- [12] Giuliani et al. (2006) *PNAS USA* 103:10834-9.
- [13] Hem & HogenEsch (2007) capitolo 4 di *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; Brevetto U.S.A. 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.
- [48] Research Disclosure, 453077 (Gen 2002)
- [49] EP-A-0378881.
- [50] EP-A-0427347.
- [51] WO93/17712
- [52] WO94/03208.
- [53] WO98/58668.

- [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.
- [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.
- [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
- [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
- [74] Gevert et al., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- [75] Brevetto U.S.A. 4,057,685.
- [76] Brevetti U.S.A. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [77] Brevetto U.S.A. 4.459.286.
- [78] Brevetto U.S.A. 5.204.098

- [79] Brevetto U.S.A. 4.965.338
- [80] Brevetto U.S.A. 4.663.160.
- [81] WO2007/000342.
- [82] WHO Technical Report Series No. 927, 2005. Pagine 64-98.
- [83] US-2008/0102498.
- [84] US-2006/0228381.
- [85] US-2007/0231340.
- [86] US-2007/0184072.
- [87] US-2006/0228380.
- [88] WO2008/143709.
- [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 edizione, ISBN: 0683306472.
- [93] WO2007/127665.
- [94] *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplan, curatori, Academic Press, Inc.)
- [95] *Handbook of Experimental Immunology*, Voll. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, curatori, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [96] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a edizione (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [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 edizione (Current Protocols).
- [99] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., curatori, 1998, Academic Press)
- [100] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2a ed. (Newton & Graham curatori, 1997, Springer Verlag)

- [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.
- [106] De Lalla et al. (1999) J. Immunol. 163:1725-29.
- [107] Kwok et al. (2001) Trends Immunol 22:583-88.
- [108] Brusica 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.
- [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.
- [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., curatori, 1987) Supplemento 30
- [121] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione immunogenica comprendente due antigeni fHBP di meningococco differenti, entrambi i quali sono adsorbiti su adiuvante di idrossifosfato di alluminio, in cui (i) entrambi gli antigeni fHBP di meningococco hanno un punto isoelettrico tra 5,0 e 7,0, (ii) l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio ha un punto di carica zero tra 5,0 e 7,0, e (iii) la composizione include un tampone per mantenere il pH nell'intervallo di 5,0 fino a 7,0.
2. Metodo per adsorbire due antigeni fHBP di meningococco differenti su un adiuvante di idrossifosfato di alluminio per dare una composizione immunogenica, in cui (i) entrambi gli antigeni fHBP di meningococco hanno un punto isoelettrico tra 5,0 e 7,0, (ii) l'adiuvante di idrossifosfato di alluminio ha un punto di carica zero tra 5,0 e 7,0, e (iii) adsorbimento di entrambi gli antigeni fHBP avviene ad un pH tra 5,0 e 7,0 in presenza di un tampone.
3. Metodo o composizione di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui entrambi gli antigeni fHBP di meningococco hanno un punto isoelettrico tra 5,0 e 6,0.
4. Metodo o composizione di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'idrossifosfato di alluminio ha un punto isoelettrico tra 5,0 e 6,0.
5. Metodo o composizione di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui (i) entrambi gli antigeni fHBP di meningococco hanno un punto isoelettrico tra 5,0 e 6,0 e (ii) l'idrossifosfato di alluminio ha un punto isoelettrico tra 5,0 e 6,0.
6. Metodo o composizione della rivendicazione 5, in cui il tampone mantiene il pH nell'intervallo di 5,0 fino a 6,0.
7. Composizione di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il tampone mantiene il pH entro 0,5 unità di pH dal punto di carica zero dell'adiuvante.
8. Composizione o metodo di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui i due antigeni fHBP differenti sono:
(i) un primo e secondo polipeptide; (ii) un primo e terzo polipeptide; o (iii) un secondo e terzo polipeptide, scelti tra:
(a) un primo polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica (i) avente almeno 84% di identità di

sequenza a SEQ. ID. N.: 1 e/o (ii) costituita da un frammento di almeno 20 amminoacidi contigui da SEQ. ID.

N.: 1;

(b) un secondo polipeptide, comprendente una sequenza amminoacidica (i) avente almeno 84% di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 2 e/o (ii) costituita da un frammento di almeno 20 amminoacidi contigui da SEQ. ID.

N.: 2;

(c) un terzo polipeptide, comprendente una sequenza amminoacidica (i) avente almeno 84% di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 3 e/o (ii) costituita da un frammento di almeno 20 amminoacidi contigui da SEQ. ID.

N.: 3.

9. Composizione o metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 fino a 7, in cui i due antigeni FHBP differenti sono: (i) un primo e secondo polipeptide; (ii) un secondo e terzo polipeptide, scelti tra:

(a) un primo polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica avente almeno 95% di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 4;

(b) un secondo polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica avente almeno 95% di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 6;

(c) un terzo polipeptide, comprendente una sequenza amminoacidica avente almeno 95% di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 5.

10. Composizione o metodo di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui i due antigeni FHBP differenti sono:

(a) un primo polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica avente almeno 95% di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 4; e (b) un secondo polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica avente almeno 95% di identità di sequenza a SEQ. ID. N.: 6.

11. Composizione o metodo della rivendicazione 10, in cui il primo polipeptide è una lipoproteina avente sequenza amminoacidica SEQ. ID. N.: 23 e il secondo polipeptide è una lipoproteina avente sequenza amminoacidica SEQ. ID. N.: 25.

12. Composizione di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la composizione non include un adiuvante di idrossido di alluminio.

13. Composizione della rivendicazione 12, comprendente un saccaride capsulare batterico coniugato.
14. Composizione o metodo di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui i polipeptidi fHBP sono lipidati ad una cisteina N-terminale, in cui il lipide comprende palmitoile.
15. Composizione o metodo di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'idrossifosfato di alluminio ha un PZC tra 5,4 e 6,2.
16. Composizione o metodo di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'idrossifosfato di alluminio ha un rapporto molare P/Al tra 0,85 e 1,0.
17. Composizione o metodo di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'idrossifosfato di alluminio è amorfo e particellare comprendente lastre con diametri di 10-100nm.
18. Composizione o metodo di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la concentrazione di Al^{+++} è <2 mg/ml.