



(10) **DE 203 21 889 U1** 2012.05.03

(12)

Gebrauchsmusterschrift

(21) Aktenzeichen: **203 21 889.2**

(22) Anmeldetag: **31.07.2003**

(47) Eintragungstag: **12.03.2012**

(43) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **03.05.2012**

(51) Int Cl.: **A61K 39/095 (2012.01)**

(30) Unionspriorität:

0218035.4	02.08.2002	GB
0218051.1	02.08.2002	GB
0218036.2	02.08.2002	GB
0218037.0	02.08.2002	GB
0220199.4	30.08.2002	GB
0220197.8	30.08.2002	GB
0225531.3	01.11.2002	GB
0225524.8	01.11.2002	GB

0030170.3	24.12.2002	GB
0230164.6	24.12.2002	GB
0005028.3	05.03.2003	GB
0230168.7	05.03.2003	GB

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:
GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart, BE

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:
**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80802, München, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

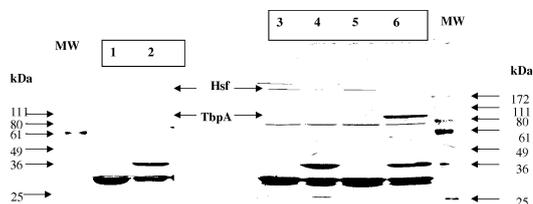
(54) Bezeichnung: **Impfstoffzusammensetzung**

(57) Hauptanspruch: Immunogene Zusammensetzung, umfassend:

(i) ein Neisseria-Autotransporterprotein-Antigen, das NadA oder Hsf ist;

(ii) ein Neisseria-Eisenaufnahmeprotein-Antigen, das Lipo28 oder TbpA ist; und

(iii) eine Vesikelzusammensetzung der äußeren Membran, umfassend LPS-Immunotyp L3; und wobei die genannten Antigene, soweit in einem Vesikel der äußeren Membran vorhanden, in dem Vesikel der äußeren Membran hochreguliert sind.



Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der immunogenen Neisseria-Zusammensetzungen und Impfstoffe, deren Herstellung und die Verwendung solcher Zusammensetzungen in der Medizin. Insbesondere betrifft sie Impfstoffzusammensetzungen, die eine Kombination von Antigenen mit solchen Eigenschaften umfassen, die den Impfstoffen der Erfindung erlauben, eine überraschend gute Immunantwort hervorzurufen, wie dies in einem Schutzassay oder einem serumbakteriziden Assay gemessen wird.

Hintergrund

[0002] Neisseria-Bakterienstämme sind die Auslöser einer Anzahl menschlicher Pathologien, gegen die effiziente Impfstoffe zu entwickeln es einen Bedarf gibt. Insbesondere Neisseria gonorrhoeae und Neisseria meningitidis verursachen Krankheiten, die durch Impfung behandelt werden könnten.

[0003] Neisseria gonorrhoeae ist der Erreger der Gonorrhoe, eine der am häufigsten beobachteten sexuell übertragenen Krankheiten der Welt, mit einer geschätzten jährlichen Inzidenz von 62 Millionen Fällen (Gerbase et al. 1998 Lancet 351; (Suppl 3) 2–4). Die klinischen Manifestationen der Gonorrhoe umfassen Entzündungen der Schleimhäute des Urogenitaltrakts, des Rachens oder Rektums und Augeninfektionen Neugeborener. Aufsteigende Gonokokkeninfektionen bei Frauen können zu Unfruchtbarkeit, Eileiterschwangerschaft, chronisch entzündlichen Erkrankungen des Beckens und Tuboovarialabszessbildung führen. Als Komplikationen der Gonorrhoe können Sepsis, Arthritis, Endokarditis und Meningitis auftreten.

[0004] Die hohe Zahl an Gonokokkenstämmen mit Antibiotikaresistenz trägt bei zu einer erhöhten Morbidität und Komplikationen, die mit Gonorrhoe assoziiert werden. Eine attraktive Alternative zur Behandlung der Gonorrhoe mit Antibiotika wäre ihre Prävention durch Impfung. Derzeit gibt es keinen Impfstoff gegen N. gonorrhoeae Infektionen.

[0005] Neisseria meningitidis ist ein wichtiger Erreger, insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen. Sepsis und Meningitis sind die lebensbedrohlichsten Formen der invasiven Meningokokkenerkrankung (IMD). Diese Krankheit hat sich aufgrund ihrer hohen Morbidität und Mortalität zu einem weltweiten Gesundheitsproblem entwickelt.

[0006] Auf der Grundlage antigener Unterschiede der Kapselpolysaccharide wurden dreizehn der N. meningitidis Serogruppen identifiziert, wobei die verbreitetsten A, B und C sind, die für 90% der Erkrankungen weltweit verantwortlich sind. Die Serogruppe B ist die häufigste Ursache von Meningokokken-Erkrankungen in Europa, den USA und einigen Ländern in Lateinamerika.

[0007] Es wurden Impfstoffe entwickelt, die auf dem Kapselpolysaccharid der Serogruppen A, C, W und Y basieren, und es wurde gezeigt, dass sie Ausbrüche von Meningokokken-Erkrankungen kontrollieren (Peltola et al., 1985, Pediatrics 76; 91–96). Allerdings ist die Serogruppe B schwach immunogen und induziert nur eine vorübergehende Antikörperantwort überwiegend des IgM-Isotyps (Ala'Aldeen D und Cartwright K 1996, J. Infect. 33; 153–157). Daher gibt es derzeit keinen breit wirksamen Impfstoff gegen Serogruppe B Meningokokken, die für den Großteil der Krankheiten in den meisten Ländern mit gemäßigttem Klima verantwortlich sind. Dies ist besonders problematisch, da die Inzidenz der Serotyp B Erkrankungen in Europa, Australien und Amerika, vor allem bei Kindern unter 5 Jahren, ansteigt. Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Serogruppe B Meningokokken ist besonders schwierig, da die Polysaccharidkapsel aufgrund ihrer immunologischen Ähnlichkeit mit menschlichem neuronalen Zelladhäsionsmolekül schwach immunogen ist. Strategien für die Herstellung von Impfstoffen haben sich daher auf an den Oberflächen exponierte Strukturen der äußeren Meningokokkenmembran konzentriert, wurden jedoch durch die ausgeprägten Variation dieser Antigene zwischen verschiedenen Stämmen behindert.

[0008] Weitere Entwicklungen haben zur Einführung von Impfstoffen geführt, die aus Vesikeln der äußeren Membran bestehen, die eine Reihe von Proteinen enthalten werden, die den normalen Inhalt der bakteriellen Membran darstellen. Einer davon ist der kubanische VA-MENGOC-BC[®] Impfstoff gegen N. meningitidis Serogruppen B und C (Rodriguez et al., 1999, Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94; 433–440). Dieser Impfstoff wurde entwickelt, um den Ausbruch einer invasiven Meningokokkenerkrankung in Kuba, der nicht durch ein Impfprogramm mit einem Kapselpolysaccharid AC Impfstoff beseitigt worden war, zu bekämpfen. Die vorherrschenden Serogruppen waren B und C, und der VA-MENGOC-BC[®] Impfstoff war bei der Kontrolle des

Ausbruchs erfolgreich, mit einer geschätzten Impfstoffeffizienz von 83% gegen die Serogruppen B Stämme von *N. meningitidis* (Sierra et al., 1990, In *Neisseria*, Walter Gruyter, Berlin, m. Atchman et al., (eds) p 129–134, Sierra et al., 1991, NIPH Ann 14, 195–210). Dieser Impfstoff war gegen einen bestimmten Ausbruch wirksam, die hervorgerufene Immunantwort würde jedoch nicht gegen andere Stämme von *N. meningitidis* schützen.

[0009] Nachfolgende Studien zur Wirksamkeit, die in Lateinamerika bei Epidemien durchgeführt wurden, die durch homologe und heterologe Serogruppe B Meningokokkenstämme verursacht wurden, haben eine gewisse Wirksamkeit bei älteren Kindern und Erwachsenen gezeigt, aber ihre Wirksamkeit war signifikant niedriger bei jüngeren Kindern, die das größte Risiko einer Infektion tragen (Milagres et al., 1994, *Infect. Immun.* 62; 4419–4424). Es ist fraglich, wie wirksam ein solcher Impfstoff in Ländern wie dem Vereinigten Königreich mit mehrstämmigen endemischen Krankheiten wäre. Studien der Immunogenizität gegen heterologe Stämme haben eine nur begrenzte kreuzreaktive serumbakterizide Aktivität gezeigt, insbesondere bei Kleinkindern (Tapero et al., 1999, *JAMA* 281; 1520 bis 1527).

[0010] Ein zweiter Impfstoff mit Vesikeln der äußeren Membran wurde in Norwegen entwickelt, wobei ein für die in Skandinavien vorherrschenden Serotypen typisches Serotyp B Isolat verwendet wurde (Fredriksen et al., 1991, NIPH Ann, 14; 67–80). Dieser Impfstoff wurde in klinischen Studien getestet und es wurde festgestellt, dass er nach 29 Monaten eine schützende Wirkung von 57% aufweist (Bjune et al., 1991, *Lancet*, 338; 1093–1096).

[0011] Allerdings ist die Verwendung von Vesikeln der äußeren Membran (OMV) in Impfstoffen mit einigen Problemen verbunden. Zum Beispiel enthalten die OMV toxische Lipopolysaccharide und sie können immundominante Antigene enthalten, die entweder stammspezifisch sind, oder variabel exprimiert werden. Mehrere Verfahren sind beschrieben worden, die dazu verwendet werden könnten, einige der Probleme der Impfstoffzubereitungen aus Vesikeln der äußeren Membran zu überwinden. WO 01/09350 beschreibt Verfahren, die einige dieser Probleme ansprechen, zum Beispiel durch Reduzieren der Toxizität und Modifizieren der Antigene, die sich auf den Vesikeln der äußeren Membran befinden.

[0012] WO 01/52885 beschreibt die Möglichkeit, Vesikel der äußeren Membran mit anderen Antigenen zu kombinieren, und beinhaltet eine Liste von über 2.000 potenziellen *Neisseria*-Proteinen, von denen spekuliert wird, dass ein Impfstoff mit Wirksamkeit gegen ein breiteres Spektrum von Serotypen entwickelt werden könnte.

[0013] Es gibt diverse Probleme mit den derzeit zur Verfügung stehenden anti-Meningokokkenimpfstoffen. Auf Proteinen basierende Impfstoffe der äußere Membran sind in der Regel nur gegen wenige Stämme spezifisch und wirksam. Polysaccharidimpfstoffe sind auch suboptimal, da sie dazu neigen, schlechte und kurze Immunantworten, insbesondere gegen Serogruppe B, auszulösen (Lepow et al., 1986; Peltola 1998, *Pediatrics* 76; 91–96).

[0014] *Neisseria* Infektionen stellen ein erhebliches Gesundheitsproblem dar, für die im Fall von *N. gonorrhoeae* keine Impfstoffe zur Verfügung stehen, oder im Fall von *N. meningitidis* Impfstoffe mit Einschränkungen in ihrer Wirksamkeit und Fähigkeit, gegen heterologe Stämme zu schützen, erhältlich sind. Offensichtlich gibt es einen Bedarf, überlegene Impfstoffe gegen *Neisseria* Infektionen zu entwickeln, die die Wirksamkeit der derzeit verfügbaren Impfstoffe verbessern und damit Schutz gegen eine breitere Palette von Stämmen erreicht werden.

Beschreibung der Abbildungen

[0015] [Abb. 1](#). – Detektion von TbpA und Hsf in OMVs, hergestellt aus einem rekombinanten *N. meningitidis* Stamm, der für die Expression der *tbpA* und *hsf* hochreguliert ist. Trennung von OMV Zubereitungen (10 µg) durch SDS-PAGE Analyse (4–20% Gradienten-Gel) mit Coomassie Brilliant Blau eingefärbt.

[0016] [Abb. 2](#). – Detektion von rekombinante Hsf Passenger Domäne, hergestellt in *E. coli* wurde, 10 µg gereinigtes Hsf Passenger Protein (Spuren 2 & 3) wurden durch SDS-PAGE auf einem 12% Gel im Vergleich zu einem Molekulargewichtsmarker (Spur 1). getrennt

[0017] [Abb. 3](#). – Analyse der Hap Passenger Reinheit, nachgewiesen durch (A) Coomassie Einfärbung (B) Silber Einfärbung, (C) anti-His5 Western Blotting and (D) anti-*E. coli*. 10 µg gereinigtes Antigen wurde durch SDS-PAGE auf einem 4–20% Acrylamid Gradienten-Gel aufgetrennt.

[0018] Abb. 4. – Regionen mit Sequenzähnlichkeit bei FrpA und FrpC Proteinen, isoliert aus *N. meningitidis* Stamm FAM20. (A) Domänen-Organisation der FrpA und FrpC Proteine des *N. meningitidis* Stamms FAM20 RTX. (B) FrpA/C Amplifizierungsprodukte, die vom *N. meningitidis* Stamm H44/76 erhalten wurden.

[0019] Abb. 5. – Expression von rekombinanten Frp23 (FrpA/C konservierte Region mit 23 Wiederholungen) Antigen in *E. coli*. SDS-PAGE-Analyse von nicht-induzierten (NI) und induzierten (I) gesamten Zellextrakten von *E. coli* BL21DE3, transformiert mit Kontrollvektoren (pET24d) oder rekombinanten Konstrukten (Frp3, Frp 13 bzw. Frp23). Die Gele wurden mit Coomassie Blau (A) eingefärbt oder auf Nitrozellulose übertragen und mit Anti-His6 Mausserum immuno-detektiert.

[0020] Abb. 6. – Bevorzugte DNA-Sequenz des in *E. coli* exprimierten FHAB 2/3rd Fragments.

[0021] Abb. 7. – Reinigung von rekombinantem FHAB 2/3rd aus induzierten *E. coli* B121DE3 Extrakten. (A) Die wichtigsten Schritte des Reinigungsprozesses. (B) SDS-PAGE Analyse der Proteinfractionen, die in verschiedenen Stufen des Reinigungsprozesses entnommen wurden.

[0022] Abb. 8. – Adhäsions blockierende Aktivitäten der Anti-Seren gegen die Antigene FHAB2/3rd, Hap, Hap Passenger-Domäne, Hsf und Hsf Passenger-Domäne aus *N. meningitidis*.

[0023] Abb. 9. – Ein Coomassie eingefärbtes Gel, das Expressionsniveaus von Hsf, TbpA und NspA in Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran, abgeleitet aus verschiedenen *N. meningitidis* Stämmen, zeigt. Spur 1 – Molekulargewichtsmarker; Spur 2 – Vesikel der äußeren Membran, hergestellt aus dem Stamm H44/76, in dem Kapselpolysaccharide herunterreguliert waren; Spur 3 – Vesikel der äußeren Membran, hergestellt aus Stamm H44/76, in dem Kapselpolysaccharide und PorA herunterreguliert waren; Spur 4 – Vesikel der äußeren Membran, hergestellt aus Stamm H44/76, in dem Kapselpolysaccharide und PorA herunterreguliert und NspA hochreguliert war; Spur 5 – Vesikel der äußeren Membran, hergestellt aus Stamm H44/76, in dem Kapselpolysaccharide und PorA herunterreguliert waren und Hsf hochreguliert war; Spur 6 – Vesikel der äußeren Membran, hergestellt aus Stamm H44/76, in dem Kapselpolysaccharide und PorA herunterreguliert waren und TbpA hochreguliert war; Spur 7 – Vesikel der äußeren Membran, hergestellt aus Stamm H44/76, in dem Kapselpolysaccharide und PorA herunterreguliert waren und TbpA und Hsf hochreguliert waren; Spur 8 – Vesikel der äußeren Membran, hergestellt aus Stamm H44/76, in dem Kapselpolysaccharide und PorA herunterreguliert waren und TbpA und NspA hochreguliert waren.

Detaillierte Beschreibung

[0024] Die vorliegende Erfindung offenbart spezielle Kombinationen von *Neisseria*-Antigenen, die in ihrer Kombination zu einer überraschenden Verbesserung der Wirksamkeit des Impfstoffes gegen *Neisseria*-Infektion führen.

[0025] *Neisseria*-Infektionen entwickeln sich in mehreren verschiedenen Phasen. Zum Beispiel beinhaltet der Meningokokken-Lebenszyklus nasopharyngeale Kolonisation, Schleimhautanhaftung, Übertritt in die Blutbahn, Vermehrung im Blut, Induktion eines toxischen Schocks, Überschreiten der Blut/Hirn Schranke und Vermehrung in der zerebrospinalen Flüssigkeit und/oder in den Hirnhäuten. Verschiedene Moleküle auf der Oberfläche des Bakteriums werden in verschiedenen Stufen des Infektionszyklus beteiligt sein. Durch Ausrichten der Immunantwort gegen eine wirksame Menge einer Kombination von bestimmten Antigenen, die in verschiedenen Prozessen der *Neisseria*-Infektion beteiligt sind, kann ein *Neisseria*-Impfstoff mit überraschend hoher Effizienz erreicht werden.

[0026] Insbesondere Kombinationen von bestimmten Antigenen aus verschiedenen Klassen, von denen einige an der Adhäsion an Wirtszellen beteiligt sind, von denen einige an der Eisenaufnahme beteiligt sind, von denen einige Autotransporter sind und von denen einige Giftstoffe sind, können eine Immunantwort auslösen, die gegen mehrere Stadien der Infektion schützt. Solche Kombinationen von Antigenen können überraschend die Impfstoffwirksamkeit gegen *Neisseria*-Infektion verbessern (vorzugsweise synergistisch verbessern), bei der mehr als eine Funktion des Bakteriums durch die Immunantwort in optimaler Weise erfasst wird.

[0027] Die Wirksamkeit von Impfstoffen kann durch eine Vielzahl von Assays geprüft werden. Schutzassays in Tiermodellen sind in der Technik gut bekannt. Darüber hinaus ist der serumbakterizide Assay (SBA) der am meisten akzeptierte immunologische Marker, um die Wirksamkeit eines meningokokkalen Impfstoffs abzuschätzen (Perkins et al., *J Infect Dis.* 1998, 177: 683–691).

[0028] Einige Kombinationen von Antigenen (z. B. Kombinationen von bestimmten Autotransporter-Proteinen und bestimmten Eisenaufnahme-Proteinen) können zu einem verbesserten Schutz in Tiermodell-Assays und/oder synergistisch höheren SBA Titern führen. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, werden solche synergistischen Kombinationen von Antigenen durch eine Reihe von Charakteristika der Immunantwort auf die Antigenkombination ermöglicht. Die Antigene selbst sind in der Regel auf Oberfläche der Neisseria-Zellen exponiert und üblicherweise konserviert, neigen jedoch auch dazu, nicht in ausreichender Menge auf der Zelloberfläche vorhanden zu sein, damit eine optimale bakterizide Antwort unter Verwendung von Antikörpern, die gegen das Antigen allein produziert wurden, stattfinden kann. Die Kombination der erfindungsgemäßen Antigene der Erfindung kann eine Formulierung ergeben, die eine vorteilhafte Kombination an bakteriziden Antikörpern hervorruft, die mit der Neisseria-Zelle über eine kritische Schwelle hinaus interagieren. Bei diesem kritischen Niveau binden ausreichend Antikörper von in ausreichender Qualität an die Oberfläche des Bakteriums, um eine effiziente Abtötung durch Komplement zu ermöglichen, und als Folge daraus werden wesentlich höhere bakterizide Effekte beobachtet.

[0029] Da serumbakterizide Assays (SBA) die Wirksamkeit von Impfstoffen eng widerspiegeln, ist das Erreichen eines guten SBA Titers durch eine Kombination von Antigenen ein guter Indikator für die schützende Wirksamkeit eines Impfstoffs, der diese Kombination von Antigenen enthält. Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Kombination von zwei Antigenen, entweder isoliert oder in einer Mischung mit anderen Antigenen angereichert. Wenn sie kombiniert werden, interagieren solche Antigenkombinationen in vorteilhafter Weise und vorzugsweise synergistisch, um eine Immunantwort, die bezüglich der bakteriziden Aktivität höher ist (zum Beispiel gemessen mittels eines serumbakteriziden Assays oder SBA) hervorzurufen, und vorzugsweise höher als die additive Antwort, die durch die einzelnen Antigene hervorgerufen wird, besonders bevorzugt um einen Faktor von mindestens 1,2, 1,5, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, am meisten bevorzugt um einen Faktor von mindestens zehn.

[0030] Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist es, dass die Kombination der Antigene der Erfindung aus verschiedenen Familien von Proteinen in einer immunogenen Zusammensetzung ein Schutz gegen eine breitere Palette von Stämmen ermöglichen kann.

[0031] Die Erfindung betrifft immunogene Zusammensetzungen, die eine Vielzahl (zwei oder mehrere) Proteine umfassen, die aus mindestens zwei verschiedenen Kategorien von Proteinen ausgewählt sind, die unterschiedliche Funktionen innerhalb Neisseria haben. Beispiele für solche Gruppen von Proteinen sind Adhäsine, Autotransporter-Proteine, Toxine, integrale Proteine der äußeren Membran und Eisenaufnahme-Proteine. Die Impfstoffkombinationen der Erfindung zeigen eine überraschende Verbesserung der Wirksamkeit des Impfstoffes gegen homologe Neisseria-Stämme (Stämme, aus denen die Antigene stammen) und vorzugsweise auch gegen heterologe Neisseria-Stämme.

[0032] Die Erfindung stellt immunogene Zusammensetzungen zur Verfügung, die mindestens oder genau zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun oder zehn verschiedene Antigene umfassen, ausgewählt aus mindestens oder genau zwei, drei, vier oder allen fünf der folgenden Kategorien von Antigenen:

- mindestens ein Neisseria-Adhäsine;
- mindestens einen Neisseria-Autotransporter;
- mindestens ein Neisseria-Toxin;
- mindestens ein Neisseria-Eisenaufnahme-Protein;
- mindestens ein Membran-assoziiertes Protein (vorzugsweise Protein der äußeren Membran, insbesondere integrales Protein der äußeren Membran) aus Neisseria.

[0033] Vorzugsweise stellt die Erfindung immunogene Zusammensetzungen bereit, die mindestens oder genau zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun oder zehn verschiedene Neisseria-Antigene umfassen. Am bevorzugtesten sind diese Antigene ausgewählt aus mindestens oder genau zwei, drei, vier oder fünf Gruppen von Proteinen, ausgewählt aus den Folgenden:

- mindestens einem Neisseria-Adhäsine, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FhaB, NspA, PilC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB 0315, NMB 0995, NMB 1119 und NadA;
- mindestens einem Neisseria-Autotransporter, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hsf, Hap, IgA Protease, AspA und NadA;
- mindestens einem Neisseria-Toxin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT und einem oder beiden der LPS Immunotypen L2 und L3;
- mindestens einem Neisseria-Eisenaufnahme-Protein, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, Lipo28 (GNA2132), Sibp, NMB0964, NMB0293, FbpA, Bcp, BfrA, BfrB und P2086 (XthA); und

- mindestens einem Membran-assoziierten Protein aus *Neisseria*, vorzugsweise einem Protein der äußeren Membran, insbesondere einem integralen Protein der äußeren Membran, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus PilQ, OMP85, FhaC, NspA, TbpA, LbpA, TspA, TspB, TdfH, PorB, MltA, HpuB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA (GNA1946), NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, und PldA (Omp1A).

[0034] Die Antigene der vorliegenden Erfindung sind alle isoliert, was bedeutet, dass sie durch die Hand des Menschen verändert sind. Vorzugsweise werden sie zu einem gewissen Grad gereinigt, am bevorzugtesten sind sie mehr als 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 oder 99% rein (vor der Vereinigung mit den anderen Komponenten der erfindungsgemäßen immunogenen Zusammensetzungen).

[0035] Vorzugsweise umfasst die erfindungsgemäße immunogene Zusammensetzung mindestens ein *Neisseria*-Adhäsion und mindestens einen *Neisseria*-Autotransporter und wahlweise ein *Neisseria*-Toxin, ein *Neisseria*-Eisenaufnahme-Protein oder ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran). Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0036] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens ein *Neisseria*-Adhäsion und mindestens ein *Neisseria*-Toxin und wahlweise einen *Neisseria*-Autotransporter, ein *Neisseria*-Eisenaufnahme-Protein oder ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran). Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0037] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens ein *Neisseria*-Adhäsion und mindestens ein *Neisseria*-Eisenaufnahme-Protein und wahlweise ein *Neisseria*-Toxin, einen *Neisseria*-Autotransporter oder ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran). Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0038] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens ein *Neisseria*-Adhäsion und mindestens ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran) und wahlweise ein *Neisseria*-Toxin, ein Eisenaufnahme-Protein aus *Neisseria* oder einen *Neisseria*-Autotransporter. Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0039] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens einen *Neisseria*-Autotransporter und mindestens ein *Neisseria*-Toxin und wahlweise ein *Neisseria*-Adhäsion, ein *Neisseria*-Eisenaufnahme-Protein oder ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran). Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0040] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens einen *Neisseria*-Autotransporter und mindestens ein *Neisseria*-Eisenaufnahme-Protein und wahlweise ein *Neisseria*-Adhäsion, ein *Neisseria*-Toxin oder ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran). Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0041] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens einen *Neisseria*-Autotransporter und mindestens ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran) und gegebenenfalls ein *Neisseria*-Adhäsion, ein *Neisseria*-Eisenaufnahmeprotein oder ein *Neisseria*-Toxin. Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0042] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens ein *Neisseria*-Toxin und mindestens ein *Neisseria*-Eisenaufnahme-Protein und wahlweise ein *Neisseria*-Adhäsion, einen *Neisseria*-Autotransporter oder ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran). Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0043] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens ein *Neisseria*-Toxin und mindestens ein Membran-assoziiertes Protein aus *Neisseria* (vorzugsweise ein integrales Protein

der äußeren Membran) und wahlweise ein Neisseria-Adhäsine, einen Neisseria-Autotransporter oder ein Neisseria-Toxin. Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0044] Vorzugsweise umfasst die immunogene Zusammensetzung der Erfindung mindestens ein Neisseria-Eisenaufnahme-Protein und mindestens ein Membran-assoziiertes Protein aus Neisseria (vorzugsweise ein integrales Protein der äußeren Membran) und wahlweise ein Neisseria-Adhäsine, einen Neisseria-Autotransporter oder ein Neisseria-Toxin. Vorzugsweise werden die Antigene aus den oben genannten Antigenen ausgewählt.

[0045] Vorzugsweise sind alle fünf Gruppen von Antigen in der immunogenen Zusammensetzung der Erfindung vertreten.

[0046] Wird ein Protein hier spezifisch erwähnt, ist es vorzugsweise ein Verweis auf ein natives Volllängen-Protein und auf seine natürlichen Varianten (d. h. auf ein natives Protein, erhältlich aus einem Neisseria-, vorzugsweise einem Meningokokken-Stamm), aber es kann auch antigene Fragmente davon umfassen (insbesondere im Zusammenhang mit Untereinheitsimpfstoffen). Diese sind Fragmente (oft spezifisch hier beschrieben), die mindestens 10 Aminosäuren, vorzugsweise 20 Aminosäuren, besonders bevorzugt 30 Aminosäuren, besonders bevorzugt 40 Aminosäuren oder am bevorzugtesten 50 Aminosäuren enthalten oder umfassen, die zusammenhängend aus der Aminosäure-Sequenz des Proteins übernommen sind. Darüber hinaus bezeichnen antigene Fragmente solche Fragmente, die immunologisch reaktiv mit Antikörpern sind, die gegen die Neisseria-Volllängen-Proteine generiert werden, oder mit Antikörpern, die durch eine Infektion eines Säugetierwirtes mit Neisseria generiert werden. Antigene Fragmente umfassen auch Fragmente, die, wenn sie in einer wirksamen Dosis verabreicht werden, eine schützende Immunantwort gegen eine Neisseria-Infektion hervorrufen, besonders bevorzugt ist es schützend gegen eine N. meningitidis- und/oder N. gonorrhoeae-Infektion, am bevorzugtesten ist es schützend gegen eine N. meningitidis-Serogruppe B-Infektion.

[0047] Die Erfindung umfasst auch rekombinante Fusionsproteine von Neisseria-Proteinen der Erfindung, oder Fragmenten davon. Diese können verschiedene Neisseria-Proteine oder deren Fragmente in das gleiche Polypeptid kombinieren. Alternativ kann die Erfindung auch einzelne Fusionsproteine der Neisseria-Proteine, oder Fragmente davon, als Fusionsprotein mit heterologen Sequenzen, wie ein Lieferant von T-Zell-Epitopen oder Reinigungs-Tags, zum Beispiel: β -Galactosidase, Glutathion-S-Transferase, grün fluoreszierendes Protein (GFP), Epitop-Tags wie FLAG, myc-Tag, Poly Histidin oder virale Oberflächenproteine wie Influenza Virus-Hämagglutinin, Tetanus-Toxoid, Diphtherie-Toxoid, CRM197.

Antigene der Erfindung

[0048] NMB Verweise beziehen sich auf Zugangsnummern von Sequenzen, auf die auf www.neisseria.org zugegriffen werden kann.

1. Adhäsine

[0049] Adhäsine umfassen FhaB (WO 98/02547), NadA (J. Exp. Med (2002) 195: 1445; NMB 1994), Hsf auch als NhhA bekannt (NMB 0992) (WO 99/31132), Hap (NMB 1985) (WO 99/55873), NspA (WO 96/29412), MafA (NMB 0652) und MafB (NMB 0643) (Annu Rev Cell Dev Biol. 16; 423–457 (2000); Nature Biotech 20; 914–921 (2002)), Omp26 (NMB 0181), NMB 0315, NMB 0995, NMB 1119 und PilC (Mol. Microbiol. 1997, 23; 879–892). Dies sind Proteine, die an der Bindung von Neisseria an die Oberfläche von Wirtszellen beteiligt sind. Hsf ist ein Beispiel sowohl für ein Adhäsine, als auch für ein Autotransporterprotein. Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können daher auch Kombinationen von Hsf und anderen Autotransporterproteinen umfassen, in denen Hsf in seiner Eigenschaft als Adhäsine mitwirkt. Diese Adhäsine können von Neisseria meningitidis oder Neisseria gonorrhoeae oder anderen Neisseriastämmen abgeleitet werden. Die Erfindung umfasst auch andere Adhäsine aus Neisseria.

FhaB

[0050] Dieses Antigen ist in WO 98/02547 SEQ ID NO 38 beschrieben (Nukleotide 3083–9025) – siehe auch NMB0497. Die Erfinder haben herausgefunden, dass FhaB allein, und insbesondere mit anderen Antigenen der Erfindung, antiadhäsive Antikörper besonders effektiv induziert. Obwohl Volllängen-FhaB verwendet werden könnte, haben die Erfinder festgestellt, dass bestimmte C-terminale Verkürzungen überraschend mindestens ebenso wirksam und vorzugsweise noch effektiver in Bezug auf die Kreuz-Stamm-Wirkung sind. Es wurde auch vorteilhaft gezeigt, dass solche Verkürzungen viel einfacher zu klonieren sind. FhaB Verkürzungen der

Erfindung entsprechen in der Regel den N-terminalen zwei Dritteln des FhaB Moleküls, vorzugsweise befindet sich der neue C-Terminus an Position 1200–1600, weiter bevorzugt an Position 1300–1500 und am meisten bevorzugt an Position 1430–1440. Spezifische Ausführungsformen haben den C-Terminus an 1433 oder 1436. Dementsprechend sind solche FhaB Verkürzungen der Erfindung und Impfstoffe, die solche Verkürzungen umfassen, unabhängige Aspekte der vorliegenden Erfindung, sowie auch Bestandteile der immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung. Der N-Terminus kann auch um bis zu 10, 20, 30, 40 oder 50 Aminosäuren verkürzt werden.

2. Autotransporter-Proteine

[0051] Autotransporter-Proteine bestehen typischerweise aus einer Signalsequenz, einer Passenger-Domäne und einer Verankerungsdomäne zur Befestigung an der äußeren Membran. Beispiele für Autotransporter-Proteine umfassen Hsf (WO 99/31132) (NMB 0992), HMW, Hia (van Ulsen et al., Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53–64), Hap (NMB 1985) (WO 99/55873; van Ulsen et al., Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53–64), UspA, UspA2, NadA (NMB 1994) (Comanducci et al., J. Exp. Med. 2002 195; 1445–1454), AspA (Infection and Immunity 2002, 70 (8); 4447–4461; NMB 1029), Aida-1 ähnliches Protein, SSh-2 und Tsh. NadA (J. Exp. Med. (2002) 195: 1445) ist ein weiteres Beispiel eines Autotransporter-Proteins, das auch ein Adhäsion ist. Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können daher auch Kombinationen von NadA und Adhäsionen umfassen, wobei NadA in seiner Eigenschaft als Autotransporter-Protein beiträgt. Diese Proteine können von *Neisseria meningitidis* oder *Neisseria gonorrhoeae* oder anderen *Neisseria*-Stämmen abgeleitet werden. Die Erfindung umfasst auch andere *Neisseria*-Autotransporter-Proteine.

Hsf

[0052] Hsf hat eine für Autotransporter-Proteine gewöhnliche Struktur. Zum Beispiel besteht Hsf vom *N. meningitidis*-Stamm H44/76 aus einer Signalsequenz bestehend aus Aminosäuren 1–51, einen Kopfbereich am Aminoterminus des reifen Proteins (Aminosäuren 52–479), der an der Oberfläche exponiert ist, und variable Bereiche enthält (Aminosäuren 52–106, 121–124, 191–210 und 230–234), einen Halsbereich (Aminosäuren 480–509), einen hydrophoben Alpha-Helix-Bereich (Aminosäuren 518–529) und eine Verankerungsdomäne, in der vier Transmembran-Stränge sich durch die äußere Membran hindurch erstrecken (Aminosäuren 539–591).

[0053] Obwohl Vollängen-Hsf in den immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden kann, können verschiedene Hsf-Verkürzungen und -Deletionen verwendet werden, je nach Art des verwendeten Impfstoffs.

[0054] Wird Hsf in einer Zusammensetzung aus Untereinheiten-Impfstoff verwendet, ist es bevorzugt, dass ein Teil der löslichen Passenger-Domäne verwendet wird; zum Beispiel die vollständige Domäne der Aminosäuren 52 bis 479, am meisten bevorzugt ein konservierter Teil davon, zum Beispiel die besonders vorteilhafte Aminosäuresequenz 134 bis 479. Bevorzugte Formen von Hsf können so verkürzt sein, dass variable Bereiche des in der WO 01/55182 offenbarten Proteins deletiert sind. Bevorzugte Varianten würden die Deletion von einer, zwei, drei, vier oder fünf variablen Regionen, wie in WO 01/55182 definiert, einschließen. Die oben genannten Sequenzen und die nachfolgend beschriebenen können um bis zu 1, 3, 5, 7, 10 oder 15 Aminosäuren an einem oder beiden Enden, dem N- und/oder C-Terminus, verlängert oder verkürzt werden.

[0055] Bevorzugte Hsf-Fragmente umfassen daher den gesamten Hsf-Kopfbereich, vorzugsweise enthalten sie die Aminosäuren 52–473. Weitere bevorzugte Hsf-Fragmente umfassen an der Oberflächen exponierte Bereiche des Kopfes, einschliesslich einer oder mehrerer der folgenden Aminosäuresequenzen, 52–62, 76–93, 116–134, 147–157, 157–175, 199–211, 230–252, 252–270, 284–306, 328–338, 362–391, 408–418, 430–440 und 469–479.

[0056] Ist Hsf in einer Zubereitung von Vesikeln der äußeren Membran anwesend, kann es als Vollängen-Protein oder vorzugsweise als vorteilhafte Variante aus einer Fusion der Aminosäuren 1–51 und 134–591 exprimiert werden (was ein reifes Protein der äußeren Membran mit der Aminosäuresequenz 134 bis zum C-Terminus ergibt). Bevorzugte Hsf-Formen können so verkürzt werden, dass variable Bereiche des aus WO 01/55182 bekannten Proteins deletiert werden. Bevorzugte Varianten würden die Deletion von einem, zwei, drei, vier oder fünf variablen Bereichen, wie in WO 01/55182 definiert, umfassen. Vorzugsweise werden die ersten und zweiten variablen Bereiche deletiert. Bevorzugte Varianten würden Reste zwischen Aminosäuresequenz 52 bis 237 oder 54 bis 237 deletieren, vorzugsweise werden Reste zwischen den Aminosäuren 52 bis 133 oder 55 bis 133 deletiert. Im reifen Protein würde das Signalpeptid fehlen.

Hap

[0057] Eine Computer-Analyse des Hap-ähnlichen Proteins aus *Neisseria meningitidis* zeigt mindestens drei strukturelle Domänen. Nimmt man die der Hap-ähnliche Sequenz des Stamms H44/76 als Referenz, dann kodiert die Domäne 1, die die Aminosäuren 1 bis 42 umfasst, ein sec-abhängiges Signalpeptid, welches für die Autotransporterfamilie charakteristisch ist, die Domäne 2, die die Aminosäuren 43 bis 950 umfasst, kodiert die Passenger-Domäne, die wahrscheinlich oberflächenexponiert und zugänglich für das Immunsystem ist, Domäne 3, die die Reste 951 bis zum C-Terminus (1457) umfasst, bei der man davon ausgeht, dass sie beta-Stränge kodiert, die sich wahrscheinlich zu einer Faß-ähnlichen Struktur zusammenfügen und in der äußeren Membran verankert werden. Da Domäne 2 wahrscheinlich oberflächenexponiert ist, gut konserviert ist (mehr als 80% in allen getesteten Stämmen) und als Zusammensetzung aus Untereinheiten-Antigene in *E. coli* hergestellt werden konnte, stellt sie einen interessanten Kandidaten für einen Impfstoff dar. Da die Domänen 2 und 3 wahrscheinlich oberflächenexponiert sind, gut konserviert sind (Pizza et al. (2000), *Science* 287: 1816–1820), stellen sie interessante Kandidaten für einen Impfstoff dar. Domain 2 ist als Passenger-Domäne bekannt.

[0058] Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können das Vollängen-Hap-Protein umfassen, vorzugsweise in eine OMV-Zubereitung eingeschlossen. Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können auch die Passenger-Domäne von Hap, die im Stamm H44/76 aus den Aminosäureresten 43–950 besteht, umfassen. Dieses Hap-Fragment würde besonders vorteilhaft in einer Zusammensetzung aus Untereinheiten der Erfindung verwendet werden. Die oben genannte Sequenz für die Hap-Passenger-Domäne kann um bis zu 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 oder 30 Aminosäuren an einem oder beiden N- oder C-Termini verlängert oder verkürzt werden.

3. Eisenaufnahme-Proteine

[0059] Eisenaufnahme-Proteine umfassen TbpA (NMB 0461) (WO 92/03467, US 5912336, WO 93/06861 und EP 586266), TbpB (NMB 0460) (WO 93/06861 und EP 586266), LbpA (NMB 1540) (*Med Microbiol* (1999) 32: 1117), LbpB (NMB 1541) (WO 99/09176), HpuA (U73112. 2) (*Mol Microbiol.* 1997, 23; 737–749), HpuB (NC_003116.1) (*Mol Microbiol* 1997, 23; 737–749), P2086 auch als XthA bekannt (NMB 0399) (13th International Pathogenic *Neisseria* Conference 2002), FbpA (NMB 0634), FbpB, BfrA (NMB 1207), BfrB (NMB 1206), Lipo 28 auch als GNA2132 bekannt (NMB 2132), Sibp (NMB 1882), HmbR, HemH, Bcp (NMB 0750), Eisen (III) ABC Transporter-Permease-Protein (Tettelin et al., *Science* 287; 1809–1815 2000), Eisen (III) ABC Transporterperiplasmatisch (Tettelin et al., *Science* 287; 1809–1815 2000), TonB-abhängiger Rezeptor (NMB 0964 und NMB 0293) (Tettelin et al., *Science* 287; 1809–1815 2000) und ein mit dem Transferrin-bindenden Protein verwandtes Protein (Tettelin et al., *Science* 287; 1809–1815 2000). Diese Proteine können von *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* oder anderen *Neisseria* Stämmen abgeleitet werden. Die Erfindung umfasst auch andere Eisenaufnahme-Proteine aus *Neisseria*.

TbpA

[0060] TbpA interagiert mit TbpB, unter Bildung eines Protein-Komplexes, der Transferrin bindet, auf der äußeren Membran von *Neisseria*. Strukturell enthält TbpA eine intrazelluläre N-terminale Domäne mit einer TonB-Box und einer Plug-Domäne, mehrere Transmembran-beta-Stränge, die durch kurze intrazelluläre und längere extrazelluläre Loops verbunden sind.

[0061] Man unterscheidet zwei Familien von TbpB, eine mit hohem Molekulargewicht und eine mit niedrigem Molekulargewicht. Die TbpB-Formen mit hohem und niedrigem Molekulargewicht assoziieren mit verschiedenen Familien von TbpA, die aufgrund der Homologie unterscheidbar sind. Trotz ähnlichen Molekulargewichts werden sie als Familien mit hohem Molekulargewicht und niedrigem Molekulargewicht bezeichnet, da sie mit den TbpB-Formen mit hohem oder niedrigem Molekulargewicht assoziieren (Rokbi et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 100; 51, 1993). Die Begriffe TbpA (hoch) und TbpA (niedrig) werden verwendet, um diese beiden Formen des TbpA zu bezeichnen, und gleiches gilt für TbpB. Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können TbpA und TbpB der Serogruppen A, B, C, Y und W-135 von *N. meningitidis*, sowie Eisenaufnahme-Proteine aus anderen Bakterien, einschließlich *N. gonorrhoeae* umfassen. Transferrin-bindende Proteine TbpA und TbpB sind auch als Tbp1 bzw. Tbp2 bezeichnet worden (Cornelissen et al., *Infection and Immunity* 65; 822, 1997).

[0062] TbpA enthält mehrere unterschiedliche Bereiche. Zum Beispiel bilden im Fall von TbpA vom *N. meningitidis*-Stamm H44/76, die 186 Aminosäuren des Aminoterminus eine interne globuläre Domäne, 22 beta-Stränge erstrecken sich über die Membran und bilden eine Beta-Faß-Struktur. Diese sind durch kurze intrazelluläre Loops und größere extrazelluläre Loops verbunden. Extrazelluläre Loops 2, 3 und 5 haben den höchsten

Grad an Sequenzvariabilität und Loop 5 ist oberflächenexponiert. Loops 5 und 4 sind an der Ligandenbindung beteiligt.

[0063] Bevorzugte TbpA-Fragmente umfassen die extrazellulären Loops von TbpA. Verwendet man die TbpA-Sequenz vom *N. meningitidis*-Stamm H44/76, entsprechen diese Loops den Aminosäuren 200–202 für Loop 1, Aminosäuren 226–303 für Loop 2, Aminosäuren 348–395 für Loop 3, Aminosäuren 438–471 für Loop 4, Aminosäuren 512–576 für Loop 5, Aminosäuren 609–625 für Loop 6, Aminosäuren 661–671 für Loop 7, Aminosäuren 707–723 für Loop 8, Aminosäuren 769–790 für Loop 9, Aminosäuren 814–844 für Loop 10 und Aminosäuren 872–903 für Loop 11. Nach einem Sequenzalignment wären die entsprechenden Sequenzen in anderen Tbp Proteinen auch bevorzugte Fragmente. Am meisten bevorzugte Fragmente würden Aminosäuresequenzen einschliessen, die Loop 2, Loop 3, Loop 4 oder Loop 5 von Tbp darstellen.

[0064] Wenn die immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung TbpA umfassen, ist es bevorzugt, sowohl TbpA (hoch) als auch TbpA (niedrig) einzuschliessen.

[0065] Obwohl TbpA vorzugsweise in einem OMV-Impfstoff präsentiert wird, kann es auch Teil eines Impfstoffes aus Untereinheiten sein. Zum Beispiel sind isolierte Eisenaufnahme-Proteine, die in eine immunogene Zusammensetzung der Erfindung eingebracht werden könnten, im Stand der Technik gut bekannt (WO 00/25811). Sie können in einem Wirtsbakterium exprimiert werden, mit Detergenz extrahiert werden (zum Beispiel 2% Elugent) und durch Affinitätschromatographie oder mit bekannten Standardtechniken der Säulenchromatographie gereinigt werden (Oakhill et al., *Biochem J.* 2002 364; 613–6).

[0066] Wird TbpA in einem OMV-Impfstoff präsentiert, kann seine Expression durch hier diskutierte genetische Verfahren hochreguliert werden, oder vorzugsweise durch Wachstum der Stammkultur unter Eisenmangel-Bedingungen, wie unten beschrieben, hochreguliert werden. Dieser Prozess wird auch zu einer Hochregulierung von variablen Eisenmangel-Proteinen, insbesondere FrpB, führen, das immundominant werden kann und es ist daher vorteilhaft, die Expression solcher Proteine (insbesondere FrpB) wie unten beschrieben herunterzuregulieren (und vorzugsweise die kodierenden Gene zu deletieren), um sicherzustellen, dass die immunogene Zusammensetzung der Erfindung eine Immunantwort gegen Antigene auslöst, die in einer Vielzahl von *Neisseria*-stämmen vorhanden ist. Es ist bevorzugt, dass sowohl TbpA (hoch) als auch TbpA (niedrig) in der immunogenen Zusammensetzung vorliegen und dies wird vorzugsweise durch die Kombination von OMVs erreicht, die aus zwei Stämmen abgeleitet sind, die alternative Formen von TbpA exprimieren.

4. Toxine

[0067] Toxine umfassen FrpA (NMB 0585; NMB 1405), FrpA/C (Definition siehe unten), FrpC (NMB 1415; NMB 1405) (WO 92/01460), NM-ADPRT (NMB 1343) (13th international Pathogenic *Neisseria* Conference 2002 Massignani et al., p135), VapD (NMB 1753), Lipopolysaccharid (LPS; auch Lipooligosaccharid oder LOS genannt) Immuntyp L2 und LPS Immuntyp L3. FrpA und FrpC enthalten einen Bereich, der zwischen diesen beiden Proteinen konserviert ist und ein bevorzugtes Fragment der Proteine wäre ein Polypeptid mit diesem konservierten Fragment, vorzugsweise bestehend aus Aminosäuren 227–1004 der Sequenz von FrpA/C. Diese Antigene können von *Neisseria meningitidis* oder *Neisseria gonorrhoeae* oder anderen *Neisseria*-Stämmen abgeleitet werden. Die Erfindung umfasst auch andere Toxine aus *Neisseria*.

[0068] In einer alternativen Ausführungsform können Toxine Antigene umfassen, die an der Regulierung der Toxizität beteiligt sind, zum Beispiel OstA, das in der Synthese von Lipopolysacchariden wirkt.

FrpA und FrpC

[0069] *Neisseria meningitidis* kodiert zwei RTX Proteine, bezeichnet als FrpA & FrpC, die bei Eisenmangel ausgeschieden werden (Thompson et al., (1993) *J. Bacteriol.* 175: 811–818; Thompson et al., (1993) *Infect. Immun.* 61: 2906–2911). Die Familie der RTX (Repeat-ToXin) Proteine hat eine gemeinsame Serie von 9 Aminosäurenwiederholungen in der Nähe ihrer C-Termini, mit dem Konsens: Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly (Asn/Asp) Asp Xaa. (LXGGXGN_DDX). Man nimmt an, dass die Wiederholungen in *E. coli* HlyA die Ca²⁺ Bindungsstelle darstellen. Wie in [Abb. 4](#) dargestellt, weisen meningokokkale FrpA- und FrpC-Proteine, wie im Stamm FAM 20 charakterisiert, eine umfangreiche Aminosäureähnlichkeit in ihren zentralen und C-terminalen Bereichen auf, aber sehr begrenzte Ähnlichkeit (falls vorhanden) am N-Terminus. Darüber hinaus weist der Bereich der zwischen FrpA und FrpC konserviert ist, einigen Polymorphismus durch Wiederholung (13 mal in FrpA und 43 mal in FrpC) eines Motivs aus 9 Aminosäuren auf.

[0070] Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können die Volllängen FrpA und/oder -FrpC, oder vorzugsweise ein Fragment, welches die zwischen FrpA und FrpC konservierte Sequenz ist umfasst, umfassen. Die konservierte Sequenz besteht aus sich wiederholenden Einheiten von 9 Aminosäuren. Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung würden vorzugsweise mehr als drei Wiederholungen, mehr als 10 Wiederholungen, mehr als 13 Wiederholungen, mehr als 20 Wiederholungen oder mehr als 23 Wiederholungen umfassen.

[0071] Solche Verkürzungen besitzen vorteilhafte Eigenschaften gegenüber den Volllängen-Molekülen, und Impfstoffe aus solchen Antigenen stellen einen unabhängigen Aspekt der Erfindung dar, und sind auch in den immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung eingeschlossen.

[0072] Sequenzen, die zwischen FrpA und FrpC konserviert sind, bezeichnet man als FrpA/C, und wo immer FrpA oder FrpC einen Bestandteil einer erfindungsgemäßen immunogenen Zusammensetzung bilden, könnte FrpA/C vorteilhaft eingesetzt werden. Aminosäuren 277–1004 der FrpA Sequenz ist die bevorzugte konservierte Region. Die obige Sequenz kann um bis zu 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 oder 30 Aminosäuren an einem oder beiden der N- oder C-Termini verlängert oder verkürzt werden.

LPS

[0073] LPS (Lipopolysaccharid, auch als LOS-Lipooligosaccharid bekannt) ist das Endotoxin auf der äußeren Membran von Neisseria. Es ist bekannt, dass die Polysaccharideinheit des LPS bakterizide Antikörper induziert.

[0074] Heterogenität innerhalb der Oligosaccharideinheit des LPS erzeugt strukturelle und antigene Vielfalt unter verschiedenen Neisseria Stämmen (Griffiss et al., Inf. Immun. 1987; 55: 1792–1800). Dies wurde dazu genutzt, Meningokokken-Stämme in 12 Immunotypen zu unterteilen (Scholtan et al., J Med Microbiol 1994, 41: 236–243). Immunotypen L3, L7, & L9 sind immunologisch identisch und strukturell ähnlich (oder sogar identisch) und wurden deshalb als L3, 7, 9 bezeichnet (oder für die Zwecke dieser Anmeldung allgemein "L3"). Meningokokkale LPS L3, 7, 9 (L3), L2 und L5 können durch Sialylierung, oder durch die Zugabe von Cytidin 5'-Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure modifiziert werden. Obwohl L2, L4 und L6 LPS immunologisch unterscheidbar sind, sind sie strukturell ähnlich, und wenn L2 hier erwähnt wird, können dafür entweder L4 oder L6 wahlweise im Rahmen der Erfindung ersetzt werden. Siehe M. P. Jennings et al., Microbiology 1999, 145, 3013–3021 und Mol Microbiol 2002, 43: 931–43 zur weiteren Erläuterung der LPS Struktur und Heterogenität.

[0075] Wenn LPS, vorzugsweise meningokokkales LPS, in einem erfindungsgemäßen Impfstoff enthalten ist, sind vorzugsweise und vorteilhafterweise eine oder beide Immunotypen L2 und L3 vorhanden. LPS wird vorzugsweise in einem Vesikel der äußeren Membran präsentiert (vorzugsweise wenn das Vesikel mit einem niedrigprozentigen Detergenz extrahiert wird, besonders bevorzugt 0–0,5%, 0,02–0,4%, 0,04–0,3%, 0,06–0,2%, 0,08–0,15% oder 0,1%, am bevorzugtesten Desoxycholat [DOC]), kann aber auch Teil eines Impfstoffs aus Untereinheiten sein. LPS kann unter Verwendung gut bekannter Verfahren isoliert werden, einschließlich des Heißwasser-Phenolverfahrens (Wesphal und Jann Meth. Carbo. Chem. 5; 83–91 1965). Siehe auch Galanos et al., 1969, Eur J Biochem 9: 245–249, und Wu et al., 1987, Anal Bio Chem 160: 281–289. LPS kann allein verwendet, oder mit einer Quelle von T-Zellen Epitopen, wie Tetanus-Toxoid, Diphtherie-Toxoid, CRM-197 oder OMV Proteinen der äußeren Membran, konjugiert werden. Techniken zur Konjugation isolierter LOS sind ebenfalls bekannt (siehe z. B. EP 941738, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird).

[0076] Wenn LOS (insbesondere LOS der Erfindung) in einer Bleb-Formulierung vorhanden ist, wird LOS vorzugsweise in situ durch Methoden, die die Konjugation von LOS mit einem oder mehreren Proteinen der äußeren Membran erlauben, die auch in der Bleb-Zubereitung vorhanden sind, (z. B. PorA oder PorB in Meningokokken), konjugiert.

[0077] Dieser Prozess kann in vorteilhafter Weise die Stabilität und/oder Immunogenizität (Bereitstellung von T-Zellen Hilfe) und/oder Antigenizität des LOS-Antigens innerhalb der Bleb-Formulierung verbessern – und somit T-Zellen Hilfe für das T-unabhängige Oligosaccharidimmunogen in seiner am meisten schützenden Konformation geben – wie LOS in seiner natürlichen Umgebung auf der Oberfläche der äußeren Membran von Meningokokken. Darüber hinaus kann die Konjugation des LOS innerhalb des Blebs zu einer Entgiftung des LOS führen (der Lipid A Teil wird stabil in der äußeren Membran verborgen und steht somit weniger zur Verfügung, um Toxizität zu verursachen). So können die hier erwähnten Entgiftungsverfahren zum Isolieren von Blebs aus htrB⁻ oder msbB⁻ Mutanten, oder durch Zugabe eines nicht-toxischen funktionalen Peptidäquivalents von Polymyxin B [ein Molekül mit hoher Affinität zu Lipid A] zur Zusammensetzung (siehe WO 93/14115,

WO 95/03327, Velucchi et al., (1997) J Endotoxin Res 4: 1–12 und EP 976402 für weitere Details nicht-toxischer funktionaler Peptidäquivalente von Polymyxin B – insbesondere die Verwendung des Peptids SAEP 2 (mit der Sequenz KTKCKFLKKC, wobei die 2 Cysteine eine Disulfidbrücke bilden)) nicht notwendig sein (die aber für zusätzliche Sicherheit in Kombination aufgenommen werden kann). So haben die Erfinder festgestellt, dass eine Zusammensetzung, die Blebs umfasst, wobei das in den Blebs befindliche LOS auf intra-Bleb Weise an Proteine der äußeren Membran konjugiert wurde, die auch im Bleb vorhanden sind, die Grundlage für einen Impfstoff für die Behandlung oder Prävention von Erkrankungen bilden kann, die durch einen Organismus, aus dem die Blebs abgeleitet sind, verursacht werden, wobei dieser Impfstoff im Wesentlichen nicht-toxisch und in der Lage ist, eine T-abhängige bakterizide Antwort gegen LOS in seiner natürlichen Umgebung hervorzurufen.

[0078] Diese Erfindung stellt daher ferner eine solche intra-Bleb LOS-konjugierte meningokokkale Bleb-Zubereitung bereit.

[0079] Solche Bleb-Präparate können aus den betreffenden Bakterien (siehe WO 01/09350) isoliert werden, und dann bekannter Konjugationschemie unterworfen werden, um Gruppen (z. B. NH_2 oder COOH) auf der Oligosaccharid Einheit von LOS mit Gruppen (z. B. NH_2 oder COOH) auf Bleb-Proteinen der äußeren Membran zu verknüpfen. Es können Vernetzungstechniken, die Glutaraldehyd, Formaldehyd oder Glutaraldehyd/Formaldehyd Mischungen verwenden, benutzt werden, es ist aber bevorzugt, dass selektivere Chemie, wie EDAC oder EDAC/NHS verwendet wird (J. V. Staros, R. W. Wright und D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water – soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220–222 (1986); and Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173–176). Andere Konjugationschemie oder Behandlungen, die dazu fähig sind, kovalente Verbindungen zwischen LOS und Proteinmolekülen herzustellen, die verwendet werden könnten, sind in EP 941738 beschrieben.

[0080] Vorzugsweise werden die Bleb-Zubereitungen in Abwesenheit von Kapselpolysaccharid konjugiert. Die Blebs können aus einem Stamm isoliert werden, der kein Kapselpolysaccharid herstellt (natürlich oder durch Mutation, wie unten beschrieben), oder sie können von den meisten und vorzugsweise allen verunreinigenden Kapselpolysacchariden gereinigt werden. Auf diese Weise ist die intra-Bleb LOS-Konjugationsreaktion viel effizienter.

[0081] Vorzugsweise sind mehr als 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, oder 95% des LOS in der Blebs vernetzt/konjugiert.

[0082] Die Intra-Bleb Konjugation sollte vorzugsweise 1, 2 oder alle 3 der folgenden Verfahrensschritte umfassen: Der Konjugations pH-Wert sollte größer als pH 7,0 sein, bevorzugt größer oder gleich pH 7,5 (am meisten bevorzugt unter pH 9); Bedingungen von 1–5%, vorzugsweise 2–4% am meisten bevorzugt etwa 3% Saccharose sollten während der Reaktion aufrecht erhalten werden; NaCl sollte in der Konjugationsreaktion minimiert werden, vorzugsweise unter 0,1 M, 0,05 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,001 M und am meisten bevorzugt überhaupt nicht vorhanden sein. Alle diese Verfahrensmerkmale stellen sicher, dass die Blebs stabil sind und während des Konjugationsverfahrens in Lösung bleiben.

[0083] Das EDAC/NHS-Konjugationsverfahren ist ein bevorzugtes Verfahren zur intra-Bleb Konjugation. EDAC/NHS ist vorzugsweise mit Formaldehyd, welches sich in einem zu hohen Ausmaß vernetzen kann, was sich nachteilig auf die Filtrierbarkeit auswirkt. EDAC reagiert mit Carbonsäuren (wie KDO in LOS) um ein Aktivester Zwischenprodukt zu erzeugen. In Anwesenheit eines Aminnukleophils (wie Lysine in Proteinen der äußeren Membran, wie PorB), wird eine Amidbindung unter Freisetzung eines Isoharnstoffnebenprodukts gebildet. Allerdings kann die Effizienz einer EDAC vermittelten Reaktion durch die Bildung eines Sulfo-NHS Esterzwischenprodukts erhöht werden. Der Sulfo-NHS Ester besteht in wässriger Lösung länger als der aktive Ester, der in der Reaktion von EDAC allein mit einem Carboxylat gebildet wird. So können höhere Ausbeuten an Bildung der Amidbindung mit diesem zweistufigen Verfahren realisiert werden. EDAC/NHS Konjugation wird in JV Staros, RW Wright und DM Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220–222 (1986); and Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173–176, besprochen. Vorzugsweise wird 0,01–5 mg EDAC/mg Bleb in der Reaktion verwendet, besonders bevorzugt 0,05–1 mg EDAC/mg Bleb. Die Menge an EDAC hängt von der in der Probe vorhanden Menge von LOS ab, was wiederum vom Desoxycholat (DOC)% abhängt, dass dazu verwendet wird, um die Blebs zu extrahieren. Bei niedrigen % DOC (z. B. 0,1%) werden große Mengen von EDAC verwendet (1 mg/mg und darüber hinaus), aber bei höheren % DOC (z. B. 0,5%), werden geringere Mengen an EDAC verwendet (0,025–0,1 mg/mg), um zu viel inter-Bleb Vernetzung zu vermeiden.

[0084] Ein bevorzugtes Verfahren der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von intra-Bleb konjugierten LOS (vorzugsweise meningokokkal), welches die Schritte der Konjugation der Blebs in der Gegenwart von EDAC/NHS bei einem pH-Wert zwischen pH 7,0 und pH 9,0 (vorzugsweise etwa pH 7,5), in 1–5% (vorzugsweise etwa 3%) Saccharose umfasst, und gegebenenfalls unter Bedingungen, die im Wesentlichen frei von NaCl sind (wie oben beschrieben), und Isolierung der konjugierten Blebs aus dem Reaktionsgemisch.

[0085] Die Reaktion kann auf Western Trenngelen der Reaktionsmischung verfolgt werden, unter Verwendung von anti-LOS (z. B. Anti-L2 oder Anti-L3) mAbs, um die Erhöhung des LOS Molekulargewichts, während die Reaktionszeit verstreicht, für einen größeren Anteil des LOS in den Blebs zu zeigen.

[0086] Ausbeuten von 99% Blebs können unter Verwendung dieser Techniken zurückgewonnen werden.

[0087] Es wurde festgestellt, dass EDAC ein ausgezeichneter intra-Bleb Vernetzer ist, da es LOS ausreichend mit OMP vernetzt, um eine verbesserte LOS T-abhängige Immunogenizität zu erreichen, es jedoch nicht in einem so hohen Grad vernetzte, dass Probleme wie schlechte Filtrierbarkeit, Aggregation und inter-Bleb Vernetzung aufgetreten sind. Die Morphologie der erzeugten Blebs war der von unkonjugierten Blebs ähnlich (im Elektronenmikroskop). Darüber hinaus verhinderte das obige Protokoll, dass eine zu hohe Vernetzung stattfand (welche die Immunogenizität von schützenden OMPs, die natürlich auf der Oberfläche des Bleb vorhanden sind, z. B. TbpA oder Hsf, verringern kann).

[0088] Es ist bevorzugt, dass der Meningokokkenstamm, aus dem die Blebs abgeleitet sind, ein mutierter Stamm ist, der kein Kapselpolysaccharid herstellen kann (z. B. einer der Mutanten-Stämme, die unten beschrieben sind, insbesondere siaD⁻). Es ist auch bevorzugt, dass immunogene Zusammensetzungen, die gegen Meningokokkenkrankung wirksam sind, sowohl ein L2 als auch ein L3 Bleb umfassen, wobei das L2 und L3 LOS beide mit Bleb-Proteinen der äußeren Membran konjugiert sind. Darüber hinaus ist es bevorzugt, dass die LOS-Struktur innerhalb des intra-Bleb konjugierten Blebs mit seiner Abstammung von einem IgtB⁻ Meningokokken-Stamm (wie unten beschrieben) konsistent ist. Am meisten bevorzugte immunogene Zusammensetzungen umfassen intra-Bleb-konjugierte Blebs: solche, die aus einem Mutanten-Meningokokken-Stamm abgeleitet sind, der Kapselpolysaccharid nicht herstellen kann und IgtB⁻ ist; umfassend L2 und L3 Blebs, die von Mutanten-Meningokokken-Stämmen abgeleitet sind, die kein Kapselpolysaccharid herstellen können; umfassend L2 und L3 Blebs, die von Mutanten-Meningokokken-Stämmen abgeleitet sind, die IgtB⁻ sind, oder am meisten bevorzugt umfassend L2 und L3 Blebs, die von mutierten meningokokkalen Stämmen abgeleitet sind, die kein Kapselpolysaccharid herstellen können und die IgtB⁻ sind.

[0089] Ein typischer L3 Meningokokken-Stamm, der in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist der H44/76 menB Stamm. Ein typischer L2 Stamm ist der B16B6 menB Stamm oder der 39E Meningokokken Typ C Stamm.

[0090] Wie bereits oben erwähnt, wurden die Blebs der Erfindung zu einem gewissen Grad durch Konjugation entgiftet und müssen nicht weiter entgiftet werden, jedoch können weitere Entgiftungsmethoden zur zusätzlichen Sicherheit verwendet werden, zum Beispiel können Blebs verwendet werden, die aus einem Meningokokken-Stamm abgeleitet sind, der htrB⁻ or msbB⁻ ist, oder man kann ein nicht-toxisches Peptid zugeben, das ein funktionales Äquivalent von Polymyxin B [ein Molekül mit hoher Affinität zu Lipid A] (vorzugsweise SEAP 2) in die Bleb Zusammensetzung (wie oben beschrieben).

[0091] In der oben beschriebenen Weise werden Meningokokken-Blebs und immunogene Zusammensetzungen, die Blebs umfassen, bereitgestellt, die als wichtiges Antigen LOS enthalten, das im Wesentlichen nicht-toxisch ist, frei von Autoimmunitätsproblemen ist, einen T-abhängigen Charakter hat, in seiner natürlichen Umgebung vorhanden ist, und in der Lage ist, eine bakterizide Antikörperantwort gegen mehr als 90% der Meningokokkenstämme hervorzurufen (im Falle von L2 + L3 Zusammensetzungen).

[0092] Vorzugsweise sollte die intra-Bleb LOS Konjugation 1, 2 oder alle 3 der folgenden Verfahrensschritte beinhalten: der pH-Wert bei der Konjugation sollte größer sein als pH 7,0, bevorzugt größer oder gleich pH 7,5 (am meisten bevorzugt unter pH 9); die Bedingungen von 1–5%, vorzugsweise 2–4%, am meisten bevorzugt etwa 3% Saccharose sollte während der Reaktion aufrecht erhalten werden; NaCl sollte in der Konjugationsreaktion minimiert werden, vorzugsweise unter 0,1 M, 0,05 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,001 M und am meisten bevorzugt überhaupt nicht vorhanden sein. Alle diese Verfahrensmerkmale stellen sicher, dass die Blebs während des Konjugationsverfahrens stabil und in Lösung bleiben.

[0093] Obwohl LOS innerhalb von Blebs an Proteine der äußeren Membran durch verschiedene Techniken und chemische Reaktionen konjugiert werden kann, ist das EDAC/NHS Konjugationsverfahren ein bevorzugtes Verfahren zur intra-Bleb Konjugation. EDAC/NHS ist bevorzugter als Formaldehyd, welches sich in einem zu hohen Ausmaß vernetzen kann und dabei die Filtrierbarkeit nachteilig beeinflusst. EDAC reagiert mit Carbonsäuren zu einem Aktivester-Zwischenprodukt. In Anwesenheit eines Aminnukleophils wird eine Amidbindung unter Freisetzung eines Isoharnstoffnebenprodukts gebildet. Allerdings kann die Effizienz einer EDAC-vermittelten Reaktion durch die Bildung eines Sulfo-NHS Esterzwischenprodukts erhöht werden. Der Sulfo-NHS Ester besteht in wässriger Lösung länger als der aktive Ester, der aus der Reaktion von EDAC allein mit einem Carboxylat gebildet wird. So können mit diesem zweistufigen Verfahren höhere Ausbeuten bei der Bildung von Amidbindungen realisiert werden. EDAC/NHS Konjugation wird in JV Staros, RW Wright und DM Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220–222 (1986); and Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173–176, besprochen.

[0094] Ein bevorzugtes Verfahren der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von intra-Bleb konjugiertem LOS (vorzugsweise meningokokkale), umfassend die Schritte der Konjugation von Blebs in der Gegenwart von EDAC/NHS bei einem pH-Wert zwischen pH 7,0 und pH 9,0 (vorzugsweise etwa pH 7,5), in 1–5% (vorzugsweise etwa 3%) Saccharose, und gegebenenfalls unter Bedingungen, die im Wesentlichen frei von NaCl sind (wie oben beschrieben) und Isolierung des konjugierten Bleb aus dem Reaktionsgemisch.

[0095] Die Reaktion kann auf Trenngelen der Reaktionsmischung unter Verwendung von anti-LOS (z. B. Anti-L2 oder Anti-L3) mAbs verfolgt werden, um die Erhöhung des LOS-Molekulargewichts während die Reaktionszeit verstreicht für einen größeren Anteil des LOS in den Blebs zu zeigen.

[0096] Ausbeuten von 99% Blebs können unter Verwendung solcher Techniken zurückgewonnen werden. Es wurde festgestellt, dass EDAC ein ausgezeichneter intra-Bleb Vernetzer ist, da es LOS ausreichend mit OMP vernetzt, um eine verbesserte LOS T-abhängige Immunogenizität zu erreichen, es jedoch nicht in einem so hohen Grad vernetzte, dass Probleme wie schlechte Filtrierbarkeit und inter-Bleb Vernetzung aufgetreten sind. Eine zu hohe Vernetzung sollte auch vermieden werden, um eine Verringerung der Immunogenizität von schützenden OMPs zu vermeiden, die natürlich auf der Oberfläche der Blebs vorhanden sind, z. B. TbpA.

5. Integrale Proteine der äußeren Membran

[0097] Andere Kategorien von Neisseria-Proteinen können auch Kandidaten für die Aufnahme in Neisseria-Impfstoffe der Erfindung sein und können möglicherweise mit anderen Antigenen in überraschend effektiver Weise kombiniert werden. Membran-assoziierte Proteine, insbesondere integrale Membranproteine und am vorteilhaftesten Proteine der äußeren Membran, vor allem integrale Proteine der äußeren Membran, können in den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Ein Beispiel für ein solches Protein ist PldA, auch als Omp1A bekannt (NMB 0464) (WO 00/15801), das ein Neisseria-Phospholipase-Protein der äußeren Membran ist. Weitere Beispiele sind TspA (NMB 0341) (Infect. Immun. 1999, 67; 3533–3541) und TspB (T-Zell stimulierendes Protein) (WO 00/03003; NMB 1548, NMB 1628 oder NMB 1747). Weitere Beispiele sind PilQ (NMB 1812) (WO 99/61620), OMP85, auch als D15 bekannt (NMB 0182) (WO 00/23593), NspA (U52066) (WO 96/29412), FhaC (NMB 0496 oder NMB 1780), PorB (NMB 2039) (Mol. Biol. Evol. 12; 363–370, 1995), HpuB (NC_003116.1), TdfH (NMB 1497) (Microbiology 2001, 147; 1277–1290), OstA (NMB 0280), MltA, auch als GNA33 bekannt und Lipo30 (NMB0033), HtrA (NMB 0532; WO 99/55872), HimD (NMB 1302), HisD (NMB 1581), GNA 1870 (NMB 1870), Hlpa (NMB 1946), NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, TbpA (NMB 0461) (WO 92/03467) (siehe auch oben unter Eisenaufnahmeproteine) und LbpA (NMB 1541).

OMP85

[0098] Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können Vollängen-OMP85, vorzugsweise als Teil einer OMV-Zubereitung, umfassen. Fragmente von OMP85 können auch in immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden, insbesondere wird die oberflächenexponierte Domäne von OMP85, bestehend aus Aminosäureresten 1–475 oder 50–475, vorzugsweise in einen Untereinheiten-Bestandteil der immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung eingebaut. Die obige Sequenz für die oberflächenexponierte Domäne von OMP85 kann um bis zu 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 oder 30 Aminosäuren an einem oder sowohl am N- als auch C-Terminus verlängert oder verkürzt werden. Es wird bevorzugt, dass die Signalsequenz aus dem OMP85 Fragment weggelassen wird.

OstA

[0099] OstA wirkt in der Synthese von Lipopolysacchariden und kann als Regulator der Toxizität angesehen werden. OstA kann alternativ in die Klasse der Toxine einbezogen werden, wobei die Kategorie der Toxine erweitert wird, um Regulatoren der Toxizität, als auch Toxine einzuschliessen.

Immunogene Zusammensetzungen

[0100] Eine immunogene Zusammensetzung ist eine Zusammensetzung, die mindestens ein Antigen, das zur Erzeugung einer Immunantwort in der Lage ist, umfasst. Vorzugsweise sind solche immunogenen Zubereitungen zur Erzeugung einer schützenden Immunantwort gegen *Neisseria* geeignet, vorzugsweise gegen eine *Neisseria meningitidis*- oder *Neisseria gonorrhoeae*-Infektion.

[0101] Die Erfindung betrifft immunogene Zusammensetzungen, umfassend mindestens zwei Antigene, die vorzugsweise eine oder mehrere einer synergistischen bakteriziden, schützenden oder adhäsionsblockierenden Antwort hervorrufen.

SBA bakterizide Assays der Erfindung

[0102] Eine solche synergistische Antwort kann mittels des SBA charakterisiert werden, hervorgerufen durch die Kombination von Antigenen, und mindestens 50%, zweimal, dreimal, vorzugsweise viermal, fünfmal, sechsmal, siebenmal, achtmal, neunmal und am meisten bevorzugt zehnmal höher als der SBA, der durch jedes Antigen allein hervorgerufen wird. Vorzugsweise wird SBA gegen einen homologen Stamm, aus dem die Antigene abstammen, und vorzugsweise auch gegen eine Reihe von heterologen Stämmen, gemessen. (Siehe unten für eine repräsentative Versuchsreihe zum Beispiel BZ10 (B:2b:P1.2), das zum A-4 Cluster gehört; B16B6 (B:2a:P1.2) aus dem ET-37 Komplex und H44/76 (B:15:P1.7,16)). SBA ist der am meisten akzeptierte immunologische Marker, um die Wirksamkeit eines Meningokokken-Impfstoffs abzuschätzen (Perkins et al., *J Infect Dis.* 1998. 177: 683–691). Befriedigendes SBA kann durch jedes bekannte Verfahren ermittelt werden. SBA kann unter Verwendung von Seren, die von Tiermodellen (siehe Beispiele 17–20), oder von menschlichen Probanden erhalten wurden, durchgeführt werden.

[0103] Ein bevorzugtes Verfahren zur Durchführung von SBA mit menschlichen Seren ist das Nachfolgende. Eine Blutprobe wird vor der ersten Impfung, zwei Monate nach der zweiten Impfung und einen Monat nach der dritten Impfung (drei Impfungen innerhalb eines Jahres entsprechen einem typischen Impfplan für die menschliche Grundimmunisierung, die zum Beispiel nach 0, 2 und 4 Monaten, oder 0, 1 und 6 Monaten verabreicht werden) abgenommen. Solche Impfpläne für die menschliche Grundimmunisierung können bei Säuglingen, die unter 1 Jahr alt sind (zum Beispiel zur gleichen Zeit wie die Hib-Impfungen durchgeführt werden) durchgeführt werden, oder 2–4 Jährige oder Jugendliche können auch mit solch einem Impfplan für die Grundimmunisierung geimpft werden, um SBA zu überprüfen. Eine weitere Blutprobe kann gegebenenfalls 6 bis 12 Monate nach der Grundimmunisierung und einen Monat nach einer Auffrischimpfung abgenommen werden.

[0104] Der SBA wird für eine Antigen- oder Bleb-Zubereitung mit homologer bakterizider Aktivität zufriedenstellend sein, wenn einen Monat nach der dritten Impfdosis (gemäß des Impfplans für die Grundimmunisierung) (in 2–4 Jährigen oder Jugendlichen, aber vorzugsweise in Säuglingen im ersten Lebensjahr) der Prozentsatz der Probanden mit einem vierfachen Anstieg in Bezug auf den SBA-Titer (Antikörperverdünnung) (im Vergleich mit dem Titer vor der Impfung) gegen den Stamm von Meningokokken, aus dem die Antigene der Erfindung abgeleitet sind, größer als 30%, vorzugsweise größer als 40%, bevorzugt größer als 50% und am meisten bevorzugt größer als 60% der Probanden ist.

[0105] Natürlich kann eine Antigen- oder eine Blebzubereitung mit heterologer bakterizider Aktivität auch eine Blebzubereitung mit homologer bakterizider Aktivität bilden, wenn sie auch zufriedenstellende SBA gegen den Meningokokken-Stamm hervorruft, aus dem sie abgeleitet ist.

[0106] Der SBA wird als zufriedenstellend für eine Antigen- oder eine Bleb-Zubereitung mit heterologer bakterizider Aktivität angesehen, wenn einen Monat nach der dritten Impfdosis (des Impfplans für die Grundimmunisierung) (in 2–4 Jährigen und Jugendlichen, aber vorzugsweise bei Säuglingen im ersten Lebensjahr) der Prozentsatz der Probanden mit einem vierfachen Anstieg in Bezug auf den SBA Titer (Antikörperverdünnung) (im Vergleich mit dem Titer vor der Impfung) gegen drei heterologe Stämme von Meningokokken größer als 20%, bevorzugt größer als 30%, mehr bevorzugt größer als 35% und am meisten bevorzugt größer als 40% ist. Ein solcher Test ist ein guter Hinweis darauf, ob die Antigen- oder Bleb-Zubereitung mit heterologer bakteri-

zider Aktivität kreuzbakterizide Antikörper gegen verschiedene Meningokokken-Stämme induzieren kann. Die drei heterologen Stämme sollten untereinander vorzugsweise einen unterschiedlichen elektrophoretischen Typ (ET) Komplex oder ein Multilocus Sequenz Typisierung (MLST) Muster aufweisen (siehe Maiden et al. PNAS USA 1998, 95: 3140–5) und vorzugsweise gegenüber dem Stamm, aus dem die Antigen- oder Blebzubereitung mit heterologer bakterizider Aktivität hergestellt oder abgeleitet wird. Ein Fachmann wird leicht dazu in der Lage sein, drei Stämme mit unterschiedlichem ET-Komplex zu bestimmen, die die genetische Vielfalt, die unter den Meningokokken beobachtet wird, reflektieren, besonders unter den Meningokokken-Typ B-Stämmen, die als die Ursache signifikanter Krankheitslast anerkannt werden und/oder die anerkannte MenB hypervirulente Linien darstellen (siehe Maiden et al., supra). Zum Beispiel sind drei Stämme, die verwendet werden könnten, Folgende: BZ10 (B:2b:P1.2), der zum A-4-Cluster gehört; B16B6 (B:2a:P1.2), der zum ET-37 Komplex gehört, und H44/76 (B:15:P1.7,16), der zum ET-5-Komplex gehört, oder jegliche andere Stämme, die zum gleichen ET/Cluster gehören. Solche Stämme können für die Prüfung einer Antigen- oder Bleb-Zubereitung mit heterologer bakterizider Aktivität verwendet werden, die zum Beispiel aus dem meningokokkalen Stamm CU385 (B: 4:P1.15), der zum ET-5 Komplex gehört, hergestellt oder davon abgeleitet wurde. Ein anderer Probenstamm, der verwendet werden könnte, stammt aus dem Lineage 3 epidemischen Klon (z. B. NZ124 [B:4:P1.7,4]). Ein weiterer ET-37 Stamm ist NGP165 (B:2a:P1.2).

[0107] Verfahren zur Messung von SBA-Aktivität sind im Stand der Technik bekannt. Ein Verfahren, das zum Beispiel angewendet werden könnte, ist in WO 99/09176 in Beispiel 10C beschrieben. Im Allgemeinen wird eine Kultur des Stammes, der geprüft werden soll (vorzugsweise unter Eisenmangelbedingungen durch die Zugabe eines Eisenchelators wie EDDA zum Wachstumsmedium), in der log-Phase des Wachstums kultiviert. Diese kann in einem Medium mit BSA (wie z. B. Hanks Medium mit 0,3% BSA) suspendiert werden, um eine funktionierende Zellsuspension zu erhalten, die auf etwa 20000 CFU/ml eingestellt ist. Eine Reihe von Reaktionsmischungen kann durch Mischen einer Reihe von zwei-fachen Verdünnungen von zu prüfenden Seren hergestellt werden (vorzugsweise bei 56°C für 30 Min hitzeinaktiviert) [zum Beispiel in einem Volumen von 50 µl/Vertiefung] und 20000 CFU/ml der zu testenden Meningokokken-Stammesuspension [z. B. in einem Volumen von 25 µl/Vertiefung]. Die Reaktionsgefäße sollten inkubiert (z. B. bei 37°C für 15 Minuten) und geschüttelt (z. B. bei 210 UpM) werden. Die endgültige Reaktionsmischung [z. B. in einem 100 µl Volumen] enthält zusätzlich eine Komplementquelle [z. B. 25% Endvolumen eines vorgeprüften Babykaninchenserums], und wird wie oben beschrieben inkubiert [z. B. 37°C für 60 Min]. Eine sterile Polystyrol U-Boden Mikrotiterplatte mit 96-Vertiefungen kann für diesen Assay verwendet werden. Ein Aliquot [z. B. 10 µl] kann aus jeder Vertiefung mit einer Mehrkanalpipette entnommen werden, auf Mueller-Hinton Agarplatten getropft (vorzugsweise mit 1% Isovitalex und 1% hitzeinaktiviertem Pferdeserum) und inkubiert werden (z. B. 18 Stunden bei 37°C in 5% CO₂). Vorzugsweise können einzelne Kolonien bis zu 80 CFU pro Aliquot gezählt werden. Die folgenden drei Proben können als Kontrollen verwendet werden: Puffer + Bakterien + Komplement; Puffer + Bakterien + inaktiviertes Komplement; Serum + Bakterien + inaktiviertes Komplement. SBA-Titer können einfach mit einem Programm berechnet werden, das die Daten verarbeitet, um eine Messung der Verdünnung zu liefern, die einer 50% Zellentötung durch Regressionsberechnung entspricht.

Tier-Schutz-Assays

[0108] Alternativ kann die synergistische Antwort durch die Wirksamkeit der Kombination von Antigenen in einem Tier-Schutz-Assay beschrieben werden. Zum Beispiel können die Assays, die in Beispiel 12 oder 13 beschrieben sind, verwendet werden. Vorzugsweise ist die Anzahl der Tiere, die durch die Kombination von Antigenen geschützt wird, im Vergleich zur Verwendung der Antigene alleine signifikant verbessert, insbesondere bei suboptimalen Antigen Dosen.

[0109] Ein erfolgreicher Impfstoff zur Prävention von Infektionen durch *N. gono* kann mehr als eines der folgenden Elemente erfordern: Erzeugung von Serum und/oder mukosaler Antikörper, um die Komplement vermittelte Abtötung der Gonokokken zu erleichtern, und/oder um Phagozytose und mikrobielle Tötung durch Leukozyten, wie polymorphnuklearer Leukozyten, zu steigern, und/oder um die Anhaftung der Gonokokken an die Wirtsgewebe zu verhindern; die Induktion einer Zell-vermittelten Immunantwort kann auch zum Schutz beitragen.

[0110] Die Verbesserung der Wirksamkeit einer Bleb gono-Impfstoffzubereitung der Erfindung kann durch die Analyse der induzierten Immunantwort für Serum und/oder mukosale Antikörper, die Anti-Anhaftungs- und/oder opsonisierende Eigenschaften und/oder bakterizide Aktivität haben, evaluiert werden, wie durch andere beschrieben wurde (McChesney D et al., Infect. Immun. 36: 1006, 1982; Boslego J et al., Efficacy trial of a purified gonococcal pilus vaccine, in Program and Abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial

Agents and Chemotherapy, Washington, American Society for Microbiology, 1984; Siegel M et al., J. Infect. Dis 145: 300, 1982; de la Pas, Microbiology, 141 (Pt4): 913–20, 1995).

[0111] Ein Mausmodell für genitale Infektion durch *N. gono* wurde kürzlich beschrieben (Plante M, J. Infect. Dis., 182: 848–55, 2000). Die Verbesserung der Wirksamkeit eines Bleb-gono-Impfstoffs der Erfindung könnte auch durch seine Fähigkeit, die Besiedlung durch *N. gono* in diesem Mausmodell der Infektion zu reduzieren oder zu verhindern, untersucht werden.

Adhäsions-Blockierungsassay

[0112] Alternativ kann die synergistische Antwort durch die Wirksamkeit der Kombination von Antigenen in einem Adhäsions-Blockierungsassay charakterisiert werden. Zum Beispiel kann der Test, der in Beispiel 11 beschrieben wird, verwendet werden. Vorzugsweise wird das Ausmaß der Blockierung, die durch Antiseren, die gegen eine Kombination von Antigenen produziert werden, induziert wird, deutlich verbessert im Vergleich zur Verwendung von Antiseren, die gegen die Antigene allein produziert werden, insbesondere bei suboptimalen Antikörperdosen.

Zusammensetzungen aus Untereinheiten

[0113] Die immunogene Zusammensetzung der Erfindung kann eine Zusammensetzung aus Untereinheiten sein.

[0114] Zusammensetzungen aus Untereinheiten sind Zusammensetzungen, in denen die Komponenten zu mindestens 50%, vorzugsweise zu mindestens 60%, 70%, 80%, 90% Reinheit isoliert und gereinigt worden sind, bevor die Komponenten gemischt werden, um die antigene Zusammensetzung zu bilden.

[0115] Die immunogene Zusammensetzung aus Untereinheiten der Erfindung umfasst vorzugsweise mindestens 2 Antigene, die aus der folgenden Liste ausgewählt werden: FhaB, PilC, HSF, Hap, NadA, OMP85, IgA-Protease, AspA, der Passenger-Domäne von AspA, der Passenger-Domäne von Hsf, der Passenger-Domäne von Hap, FrpA, FrpC, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, TspA, TspB, PldA, PilQ, FhaC, NspA und eine oder beide des LPS Immunotypen L2 und L3.

[0116] Zusammensetzungen aus Untereinheiten können wässrige Lösungen von wasserlöslichen Proteinen sein. Sie können ein Detergenz, bevorzugt ein nicht-ionisches, zwitterionisches oder ionisches Detergenz umfassen, um hydrophobe Teile der Antigene zu lösen. Sie können Lipide umfassen, so dass Liposomstrukturen gebildet werden können, die die Präsentation von Antigenen mit einer Struktur, die sich über eine Lipidmembran erstrecken, ermöglicht.

Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran

[0117] *N. meningitidis* der Serogruppe B (MenB) scheidet äußere Membran-Blebs in ausreichenden Mengen aus, um ihre Herstellung im industriellen Maßstab zu ermöglichen. Ein Vesikel der äußeren Membran kann auch durch ein Verfahren zur Detergenz-Extraktion aus den Bakterienzellen hergestellt werden (siehe zum Beispiel EP 11243).

[0118] Die immunogene Zusammensetzung der Erfindung kann auch eine Zubereitung von Vesikeln der äußeren Membran mit mindestens zwei Antigenen umfassen, die entweder rekombinant oder eine andere Weise, die Wachstum unter Eisen-abgereicherten Bedingungen umfassen, hochreguliert worden sind. Beispiele für Antigene, die in einer solchen Zubereitung von Vesikeln der äußeren Membran hochreguliert wären, umfassen: NspA, Hsf, Hap, OMP85, TbpA (hoch), TbpA (niedrig), LbpA, TbpB, LbpB, PilQ, AspA, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, MafA, MafB und PldA. Solche Präparate würden gegebenenfalls auch eine oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3 umfassen.

[0119] Die Herstellung von Bleb-Zubereitungen aus *Neisseria*-Stämmen kann durch jedes dem Fachmann bekannte Verfahren ausgeführt werden. Vorzugsweise werden Verfahren verwendet, die offenbart sind in: EP 301992, US 5,597,572, EP 11243 oder US 4,271,147, Frederikson et al., (NIPH Annals [1991], 14: 67–80), Zollinger et al., (J. Clin. Invest. [1979], 63: 836–848), Saunders et al., (Infect. Immun. [1999], 67: 113–119), Drabick et al., (Vaccine [2000], 18: 160–172) oder WO 01/09350 (Beispiel 8).

[0120] Im Allgemeinen werden OMVs mit einem Detergens, vorzugsweise Desoxycholat, extrahiert und die Nukleinsäuren werden optional enzymatisch entfernt. Die Reinigung erfolgt durch Ultrazentrifugieren, wahlweise mit nachfolgender Größenausschlusschromatographie. Wenn 2 oder mehr verschiedene Blebs der Erfindung mit eingeschlossen sind, können sie in einem einzigen Behälter kombiniert werden, um eine multivalente Zubereitung der Erfindung zu bilden (obwohl eine Zubereitung auch dann als multivalent angesehen wird, wenn die verschiedenen Blebs der Erfindung separate Zusammensetzungen in getrennten Behältern sind, die zur gleichen Zeit an einen Wirt verabreicht werden [der gleiche Besuch bei einem Arzt]). OMV-Zubereitungen werden in der Regel durch Filtrieren durch einen 0,2 µm Filter sterilisiert, und werden vorzugsweise in einer Saccharoselösung (z. B. 3%), die bekanntlich Bleb-Zubereitungen stabilisiert, gelagert.

[0121] Die Hochregulierung von Proteinen in Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran kann durch Insertion einer zusätzlichen Kopie eines Gens in den Neisseria-Stamm, aus dem die OMV-Zubereitung abgeleitet ist, erreicht werden. Alternativ kann das Promotorgen gegen einen stärkeren Promotor im Neisseria-Stamm, aus dem die OMV-Zubereitung abgeleitet ist, ausgetauscht werden. Solche Techniken sind in WO 01/09350 beschrieben. Hochregulierung eines Proteins führt zu einem höheren Proteinniveau im OMV im Vergleich zum Niveau des Proteins im OMV aus unmodifizierten *N. meningitidis* (zum Beispiel der Stamm H44/76). Vorzugsweise wird das Niveau 1-, 5-, 2-, 3-, 4-, 5-, 7-, 10- oder 20-mal höher sein.

[0122] Ist es beabsichtigt, dass LPS ein zusätzliches Antigen in der OMV sein soll, kann vorzugsweise ein Protokoll, das eine niedrige Konzentration von Extraktionsdetergens verwendet (zum Beispiel Desoxycholat oder DOC), im OMV-Herstellungsverfahren verwendet werden, um so ein hohes Niveau an gebundenen LPS beizubehalten, während besonders toxisches, schlecht gebundenes LPS entfernt wird. Die Konzentration des verwendeten DOC ist vorzugsweise 0–0,5% DOC, 0,02–0,4% DOC, 0,04–0,3% DOC, mehr bevorzugt 0,06%–0,2% DOC, oder 0,08–0,15% DOC, am meisten bevorzugt ungefähr oder genau 0,1% DOC.

[0123] "Stärkere Promotorsequenz" bezieht sich auf ein regulatorisches Kontrollelement, das die Transkription für ein Gen, das das Antigen von Interesse kodiert, erhöht.

[0124] "Hochregulierende Expression" bezieht sich auf jedes Mittel zur Steigerung der Expression eines Antigens von Interesse, bezogen auf die des nicht modifizierten (d. h. natürlich vorkommenden) Blebs. Es versteht sich, dass das Maß an „Hochregulierung“ abhängig vom jeweiligen Antigen von Interesse variiert, es wird jedoch ein Maß nicht überschreiten, das die Integrität der Membran des Blebs stört. Hochregulierung eines Antigens bezieht sich auf eine Expression, die mindestens 10% höher als die des nicht modifizierten Blebs ist. Vorzugsweise ist sie um mindestens 50% höher. Besonders bevorzugt ist sie mindestens 100% (2-fach) höher. Am meisten bevorzugt ist sie 3, 4, 5, 7, 10, 20-fach höher. Alternativ oder zusätzlich kann die hochregulierende Expression sich darauf beziehen, dass die Expression unabhängig von metabolischen Änderungen oder Ernährungsänderungen gemacht wird, vor allem im Fall von TbpA, TbpB, LbpA und LbpB. Vorzugsweise wird das Niveau der Expression beurteilt, wenn Blebs aus Bakterien abgeleitet wurden, die unter Eisenmangelbedingungen (zum Beispiel in der Gegenwart eines Eisenchelators) kultiviert worden sind.

[0125] Um es noch mal klar zu stellen, bezieht sich der Ausdruck „einen Bakterienstamm zu konstruieren, der weniger vom besagten Antigen herstellt“, oder Herunterregulieren auf alle Mittel zur Verringerung der Expression eines Antigens (oder die Expression eines funktionellen Genprodukts) von Interesse, bezogen auf das des nicht modifizierten (d. h. des natürlich vorkommenden) Blebs, vorzugsweise durch Deletion, so dass die Expression wenigstens 10% niedriger ist, als die des nicht modifizierten Blebs. Vorzugsweise ist sie mindestens 50% niedriger, und am meisten bevorzugt ist sie vollständig abwesend. Wenn das herunterregulierte Protein ein Enzym oder ein funktionelles Protein ist, kann die Herunterregulierung durch die Einführung einer oder mehrerer Mutationen erreicht werden, wobei eine 10%-, 20%-, 50%-, 80%- oder vorzugsweise eine 100%-ige Reduktion der enzymatischen oder funktionellen Aktivität erreicht wird.

[0126] Die Konstruktionsschritte, die notwendig sind, um die Expression von Neisseria-Proteinen zu modulieren, können durch eine Vielzahl von dem Fachmann bekannten Möglichkeiten ausgeführt werden. Zum Beispiel können Sequenzen (z. B. Promotoren oder offene Leserahmen) eingefügt werden, und Promotoren/Gene können durch die Technik der Transposoninsertion gestört werden. Um zum Beispiel die Expression eines Gens hochzuregulieren, könnte ein starker Promotor bis zu 2 kb vom Startcodon des Gens upstream gelegen über ein Transposon eingefügt werden (mehr bevorzugt 200 bis 600 bp upstream gelegen, am meisten bevorzugt etwa 400 bp upstream gelegen). Punktmutation oder Deletion können auch verwendet werden (insbesondere für die Herunterregulierung der Expression eines Gens).

[0127] Solche Methoden können jedoch recht instabil oder unsicher sein, und deshalb ist es bevorzugt, dass der Konstruktionsschritt über ein homologes Rekombinationsereignis durchgeführt wird. Vorzugsweise findet das Ereignis zwischen einer Sequenz (einer rekombinogenen Region) von mindestens 30 Nukleotiden auf dem bakteriellen Chromosom, und einer Sequenz (einer zweiten rekombinogenen Region) von mindestens 30 Nukleotiden auf einem Vektor statt, der in den Stamm transformiert wurde. Vorzugsweise sind die Regionen 40–1000 Nukleotide, besonders bevorzugt 100–800 Nukleotide, am meisten bevorzugt 500 Nukleotide). Diese rekombinogenen Regionen sollten ausreichend ähnlich sein, damit sie in der Lage sind, unter hochstringenten Bedingungen miteinander zu hybridisieren.

[0128] Methoden, die zur Durchführung der hier beschriebenen gentechnischen Modifikationsereignisse verwendet werden (wie z. B. die Hochregulierung oder Herunterregulierung von Genen durch Rekombinationsereignisse und die Einführung weiterer Gensequenzen in ein *Neisseria*-Genom) werden in WO 01/09350 beschrieben. Typische starke Promotoren, die in *Neisseria* integriert werden können, sind *porA*, *PorB*, *IgtF*, *Opa*, *p110*, *Ist*, und *hpuAB*. *PorA* und *PorB* werden als konstitutive, starke Promotoren bevorzugt. Es wurde festgestellt, dass die *PorB*-Promotoraktivität in einem Fragment enthalten ist, das den Nukleotiden –1 bis –250 entspricht, die upstream vom Startkodon von *porB* gelegen sind.

Hochregulierung der Expression von Antigenen durch Wachstum in Medien mit Eisenmangel

[0129] Die Hochregulierung der Expression von bestimmten Antigenen in einer Zusammensetzung der Erfindung wird vorzugsweise durch Isolierung der Vesikel der äußeren Membran aus einem Mutterstamm von *Neisseria* erreicht, der unter Bedingungen des Eisenmangels kultiviert wurde. Eine niedrige Konzentration von Eisen im Medium wird zu einer erhöhten Expression von Proteinen führen, die an der Eisenaufnahme beteiligt sind, einschließlich *TbpA*, *TbpB*, *LbpA*, *LbpB*, *HpuA*, *HpuB* und *P2086*. Die Expression dieser Proteine wird damit ohne die Notwendigkeit zur rekombinanten Modifizierung des beteiligten Gens, zum Beispiel durch das Einfügen eines stärkeren Promotors, oder das Einfügen einer zusätzlichen Kopie des Gens, hochreguliert. Die Erfindung würde auch die Hochregulierung von Eisenaufnahme-Proteinen durch Wachstum in Medium mit Eisenmangel umfassen, wobei auch das Gen rekombinant verändert wurde.

[0130] Eisenmangel wird durch die Zugabe eines Eisenchelators zum Kulturmedium erreicht. Geeignete Eisenchelatoren umfassen 2,2-Dipyridyl, EDDHA (Ethylendiamin-di(o-Hydroxyphenyl)essigsäure) und Desferal (Deferoxamine Mesylat, Sigma). Desferal ist der bevorzugte Eisenchelatbildner und wird dem Kulturmedium in einer Konzentration von zwischen 10 und 100 μM , vorzugsweise 25–75 μM , mehr bevorzugt 50–70 μM , am meisten bevorzugt 60 μM , zugesetzt. Der Eisengehalt des Mediums stammt vor allem vom Hefeextrakt und Bestandteilen des Sojapeptons, und die vorhandene Menge kann zwischen den Batches variieren. Deshalb können verschiedene Konzentrationen von Desferal optimal sein, um die Hochregulierung der Eisenaufnahme-Proteine in verschiedenen Batches des Mediums zu erreichen. Es sollte für den Fachmann einfach sein, die optimale Konzentration zu bestimmen. Allgemein sollte dem Medium genügend Eisenchelator zugesetzt werden, um die Expression des gewünschten eisenregulierten Proteins hochzuregulieren, aber nicht so viel, dass das Wachstum der Bakterien beeinträchtigt wird.

[0131] Vorzugsweise wird die Hochregulierung der Eisenaufnahme-Proteine durch Wachstum unter eisenlimitierten Bedingungen mit rekombinanter Hochregulierung von anderen Antigenen verbunden, um die Vesikel der äußeren Membran der Erfindung zu erhalten.

Herunterregulierung/Entfernen von variablen und nicht-schützenden immunodominanten Antigenen

[0132] Viele Oberflächenantigene zwischen Bakterienstämmen sind variabel und schützen daher nur gegen eine begrenzte Anzahl von eng verwandten Stämmen. Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung umfaßt Vesikel der äußeren Membran der Erfindung, in denen die Expression anderer Proteine verringert ist, oder bevorzugt, in denen ein Gen/Gene, die variable Oberflächenprotein(e) kodieren, deletiert sind. Solch eine Löschung führt zu einem Bakterienstamm, der Blebs produziert, die, wenn sie in einem Impfstoff verabreicht werden, aufgrund eines höheren Einflusses, der von konservierten Proteinen (an den äußeren Membranen beibehalten) auf das Immunsystem des Impflings ausgeübt wird, ein größeres Potenzial für Kreuzreaktivität gegen verschiedene Stämme haben. Beispiele solcher variabler Antigene in *Neisseria*, die in den immunogenen Bleb-Zusammensetzungen der Erfindung herunterreguliert werden können, umfassen *PorA*, *PorB*, *Opa*.

[0133] Andere Arten von Genen, die herunterreguliert oder abgeschaltet werden könnten, sind Gene, die in vivo leicht durch das Bakterium angeschaltet (exprimiert) oder ausgeschaltet werden können. Da Proteine der äußeren Membran, die von diesen Genen kodiert werden, nicht immer auf den Bakterien vorhanden sind, kann

sich das Vorhandensein solcher Proteine in den Bleb-Zubereitungen aus den oben genannten Gründen auch nachteilig für die Wirksamkeit des Impfstoffs auswirken. Ein bevorzugtes Beispiel, um herunterzuregulieren, oder zu deletieren, ist das Neisseria Opc Protein. Anti-Opc Immunität, die durch einen Opc enthaltenden Bleb-Impfstoff induziert wird, würde nur eine begrenzte Schutzwirkung haben, da der Erreger leicht Opc⁻ werden könnte.

[0134] Zum Beispiel können diese variablen oder nicht-schützenden Gene in der Expression herunterreguliert, oder endgültig ausgeschaltet werden. Dies hat den Vorteil, das Immunsystem auf bessere Antigene zu konzentrieren, die in geringen Mengen auf der äußeren Oberfläche der Blebs sind. Mit Herunterregulierung ist auch gemeint, dass oberflächenexponierte, variable immundominante Loops der oben genannten Proteine der äußeren Membran verändert oder deletiert werden können, damit das daraus resultierende Protein der äußeren Membran weniger immundominant gemacht wird.

[0135] Verfahren zur Herunterregulierung der Expression sind in WO 01/09350 offenbart. Bevorzugte Kombinationen von Proteinen, die in den immunogenen Bleb-Zusammensetzungen der Erfindung herunterreguliert werden sollen, schliessen PorA und OpA; PorA und OpC, OpA und OpC; PorA und OpA und OpC ein.

[0136] Von vier verschiedenen Opa-Genen ist bekannt, dass sie im Meningokokken-Genom existieren (Aho et al., 1991 Mol. Microbiol. 5: 1429–1437); wenn daher gesagt wird, dass Opa in der Expression herunterreguliert wird, dann ist gemeint, dass vorzugsweise 1, 2, 3 oder (vorzugsweise) alle 4 Gene, die in Meningokokken vorhanden sind, so herunterreguliert sind. Solch eine Herunterregulierung kann gentechnisch, wie in WO 01/09350 beschrieben wird, oder durch Ermittlung einfach zu findender, natürlicher, stabiler Meningokokken-Stämme, die keine oder nur geringe Expression von den Opa-loci haben, durchgeführt werden. Solche Stämme können mit Hilfe der Technik gefunden werden, die in Poolman et al., (1985 J. Med. Micro. 19: 203–209) beschrieben wird, worin Zellen, die Opa sind, einen anderen Phänotyp haben, als Zellen, die Opa exprimieren, was erkannt werden kann, wenn man das Aussehen der Zellen auf Platten oder unter einem Mikroskop betrachtet. Ist er einmal gefunden, kann gezeigt werden, dass der Stamm stabil Opa ist, indem ein Western-Blot auf Zellinhalten nach einer Fermentierung ausgeführt wird, um den Mangel an Opa zu etablieren.

[0137] Wird die Hochregulierung von bestimmten Antigenen in Vesikeln der äußeren Membran durch Wachstum unter Bedingungen des Eisenmangels erreicht, wird das variable Protein FrpB auch hochreguliert werden (Microbiology 142: 3269–3274 (1996); J. Bacteriol. 181: 2895–2901 (1999)). Die Erfinder haben herausgefunden, dass es vorteilhaft ist, die Expression von FrpB unter diesen Umständen durch Herunterregulieren der Expression des gesamten Proteins, wie in WO 01/09350 beschrieben, oder durch Deletieren variabler Region(en) von FrpB, herunterzuregulieren. Dadurch wird sichergestellt, dass die Immunantwort, die durch die immunogene Zusammensetzung hervorgerufen wird, auf Antigene gerichtet ist, die in einer Vielzahl von Stämmen vorhanden ist. Herunterregulierung von FrpB wird vorzugsweise mit der Herunterregulierung von PorA und OpA; PorA und OpC; OpA und OpC; PorA und OpA und OpC in den immunogenen Bleb-Zusammensetzungen der Erfindung kombiniert.

[0138] In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung ist FrpB in Vesikeln der äußeren Membran, die aus Neisseria-Stämmen hergestellt wurden, die nicht unter Eisenmangel-Bedingungen gewachsen wurden, herunterreguliert.

Entgiftung von LPS

[0139] Die Blebs in den immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung können durch Verfahren zur Entgiftung von LPS, die in WO 01/09350 offenbart werden, entgiftet werden. Insbesondere beinhalten Verfahren zur Entgiftung von LPS der Erfindung die Herunterregulierung/Deletierung von htrB- und/oder msbB-Enzymen, die in WO 01/09350 offenbart sind. Die msbB- und htrB-Gene von Neisseria werden auch lpxL1 und lpxL2 genannt (WO 00/26384) und Deletions-Mutationen dieser Gene sind phänotypisch charakterisiert durch den msbB-Mutante LOS, oder eine sekundäre Acylkette verloren geht), und die htrB-Mutante LOS, der beide sekundären Acylketten verloren gehen. WO 93/14155 und WO 95/03327 beschreiben nicht-toxische peptidfunktionale Äquivalente von Polymycin B, die in den Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden können.

[0140] Solche Verfahren werden bevorzugt mit Verfahren der Bleb-Extraktion mit niedrigen DOC-Niveau kombiniert, vorzugsweise 0–0,3% DOC, mehr bevorzugt 0,05%–0,2% DOC, am meisten bevorzugt ungefähr oder genau 0,1% DOC.

[0141] Weitere Verfahren der LPS-Entgiftung umfassen die Zugabe eines ungiftigen peptidfunktionalen Äquivalents von Polymyxin-B (vorzugsweise SAEP 2) zu den Bleb-Zusammensetzungen wie oben beschrieben.

Kreuzreaktive Polysaccharide

[0142] Die Isolierung der bakteriellen Blebs der äußeren Membran von verkapselten Gram-negativen Bakterien führt häufig zur Mitaufreinigung von Kapselpolysaccharid. In einigen Fällen kann dieses "verunreinigende Material" sich als nützlich erweisen, da Polysaccharide die Immunantwort erhöhen können, die von anderen Bleb-Komponenten verliehen wird. In anderen Fällen kann sich jedoch die Anwesenheit von kontaminierendem Polysaccharidmaterial in bakteriellen Bleb-Zubereitungen als schädlich für die Nutzung der Blebs in einem Impfstoff erweisen. So hat es sich zumindest im Fall von *N. meningitidis* gezeigt, dass die Serogruppe B-Kapselpolysaccharide keine schützende Immunität verleiht und anfällig für die Auslösung einer negativen Auto-Immunantwort bei Menschen ist. Folglich können erfindungsgemäße Vesikel aus der äußeren Membran aus einem Bakterienstamm für die Bleb-Herstellung isoliert werden, der so konstruiert worden ist, dass er frei von Kapselpolysaccharid ist. Die Blebs werden dann für den Einsatz beim Menschen geeignet sein. Ein besonders bevorzugtes Beispiel für eine solche Bleb-Zubereitung ist eine von *N. meningitidis* der Serogruppe B ohne Kapselpolysaccharid.

[0143] Dies kann durch Verwendung von modifizierten Bleb-Herstellungsstämmen erreicht werden, in denen die Gene, die für die Kapselbiosynthese und/oder den Export notwendig sind, abgeschwächt worden sind. Die Inaktivierung des Gens für die Kapselpolysaccharid-Biosynthese oder den Export kann durch Mutation (Punktmutation, Deletion oder Insertion) entweder der Kontrollregion, der kodierenden Region oder beider (vorzugsweise unter Verwendung der homologen Rekombinationstechniken, die oben beschriebenen sind), oder durch irgendeine andere Weise durch Verringerung der enzymatischen Funktion solcher Gene erreicht werden. Darüber hinaus kann die Inaktivierung von Kapsel-Biosynthesegenen auch durch Antisense-Überexpression oder Transposon-Mutagenese erzielt werden. Eine bevorzugte Methode ist die Deletion von einigen oder allen der *Neisseria meningitidis* cps Gene, die für die Polysaccharidbiosynthese und den Polysaccharid-export erforderlich sind. Zu diesem Zweck kann das Austauschplasmid pMF121 (beschrieben in Frosh et al., 1990, Mol. Microbiol. 4: 1215–1218) verwendet werden, um eine Mutation zu liefern, die den cpsCAD (+ galE) Gencluster liefert.

[0144] Die Sicherheit von Antikörpern, die gegen L3 oder L2 LPS produziert werden, wurde wegen des Vorhandenseins einer Struktur, die der Lacto-N-Neotetraose-Oligosaccharidgruppe (Gal β 1–4GlcNAc β 1–3Gal β 1–4Glc β 1-) im menschlichen Glykosphingolipid ähnlich ist, in Frage gestellt. Selbst wenn eine große Zahl von Menschen sicher mit Desoxycholat-extrahierten Vesikelimpfstoffen geimpft wurde, die eine Restmenge an L3 LPS enthalten (G. Bjune et al, Lancet (1991), 338, 1093–1096; GVG. Sierra et al., NIPH ann (1991), 14, 195–210), ist die Deletion des terminalen Teils des LOS-Saccharids bei der Verhinderung einer Kreuzreaktion mit Strukturen an der Oberfläche von menschlichen Geweben von Vorteil. In einer bevorzugten Ausführungsform führt die Inaktivierung des lgtB-Gens zu einer intermediären LPS-Struktur, in der der terminale Galactoserest und die Sialinsäure fehlen (die Mutation hinterlässt eine 4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Struktur in L2 und L3 LOS). Solche Zwischenprodukte könnten in einem L3 und L2 LPS-Stamm gewonnen werden. Eine alternative und weniger bevorzugte (kurze) Version des LPS kann durch Abschalten des lgtE-Gens erhalten werden. Eine weitere Alternative und weniger bevorzugte Variante des LPS kann durch Abschalten des lgtA-Gens erhalten werden. Wenn eine solche lgtA-Mutation ausgewählt wird, ist es bevorzugt, auch die lgtC-Expression auszuschalten, um die Bildung von nicht immunogenen L1 Immunotyp zu verhindern.

[0145] lgtB-Mutanten sind am meisten bevorzugt, da die Erfinder festgestellt haben, dass dies die optimale Verkürzung ist, um das Problem der Sicherheit zu lösen, und gleichzeitig ein schützendes LPS-Oligosaccharidepitop, das eine bakterizide Antikörperantwort induzieren kann, beizubehalten.

[0146] Daher werden erfindungsgemäße immunogene Zusammensetzungen, die weiterhin L2- oder L3-Zubereitungen (gereinigt oder in einem isolierten Bleb) oder Meningokokken-Bleb-Zubereitungen enthalten, im Allgemeinen vorteilhaft von einem *Neisseria*-Stamm (vorzugsweise einem Meningokokken-Stamm) abgeleitet, der genetisch so verändert wurde, dass die Expression von funktionellen Genprodukten der lgtB-, lgtA- oder lgtE-Gene, vorzugsweise durch Ausschalten des Gens, am meisten bevorzugt durch Deletion des gesamten oder eines Teils des Promotors und/oder des offenen Leserahmens des Gens, dauerhaft herunterreguliert ist.

[0147] Sind die vorgenannten erfindungsgemäßen immunogenen Zusammensetzungen aus einem Meningokokken-B-Stamm abgeleitet, ist es weiter bevorzugt, dass das Kapselpolysaccharid (das auch human-ähnliche Saccharidstrukturen enthält) ebenfalls entfernt wird. Obwohl viele Gene ausgeschaltet werden könnten,

um dies zu erreichen, haben die Erfinder vorteilhaft gezeigt, dass es bevorzugt ist, dass der Bleb-Produktionsstamm gentechnisch verändert wird, um dauerhaft die Expression von funktionellem Genprodukt aus dem *siaD* Gen herunterzuregulieren (d. h. Herunterregulieren der α -2-8 Polysialyltransferase-Aktivität), vorzugsweise durch Ausschalten des Gens, am meisten bevorzugt durch Deletion des gesamten oder eines Teils des Promotors und/oder offenen Leserahmens des Gens. Eine solche Inaktivierung ist in WO 01/09350 beschrieben. Die *siaD*- (auch als *synD* bekannte) Mutation ist die günstigste der vielen Mutationen, die aus der Beseitigung des human-ähnlichen Epitops aus dem Kapselpolysaccharid entstehen kann, weil es eine der wenigen Mutationen ist, die keine Wirkung auf die Biosynthese der schützenden Epitope des LOS hat, und damit in einem Prozess, der letztlich darauf zielt, LOS als schützendes Antigen zu verwenden, vorteilhaft ist und einen minimalen Einfluss auf das Wachstum des Bakteriums hat. Ein bevorzugter Aspekt der Erfindung ist daher eine immunogene Bleb-Zubereitung, wie oben beschrieben, die von einem *IgtE*⁻ *siaD*⁻ abgeleitet ist, einem *IgtA*⁻ *siaD*⁻ oder vorzugsweise einem *IgtB*⁻ *siaD*⁻ Meningokokken B-Mutantenstamm. Der Stamm selbst ist ein weiterer Aspekt der Erfindung.

[0148] Obwohl eine *siaD*⁻-Mutation aus den oben genannten Gründen bevorzugt ist, können auch andere Mutationen, die die Meningokokken B-Kapselpolysaccharidsynthese ausschalten, verwendet werden. Daher kann der Bleb-Produktionsstamm gentechnisch verändert werden, um dauerhaft die Expression funktioneller Genprodukte eines oder mehrerer der folgenden Gene herunterzuregulieren: *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA* (entspricht *synX* und *siaA*), *synB* (entspricht *siaB*) oder *synC* (entspricht *siaC*) Gene, vorzugsweise durch Ausschalten des Gens, am meisten bevorzugt durch das Deletieren des gesamten oder eines Teils des Promotors und/oder offenen Leserahmens des Gens. Die *IgtE*⁻-Mutation kann mit einer oder mehreren dieser Mutationen kombiniert werden. Vorzugsweise ist die *IgtB*⁻-Mutation mit einer oder mehreren dieser Mutationen kombiniert. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist daher eine immunogene Bleb-Zubereitung wie oben beschrieben, die aus einem solchen kombinierten Mutanten-Stamm von Meningokokken B abgeleitet ist. Der Stamm selbst ist ein weiterer Aspekt der Erfindung.

[0149] Ein *Neisseria*-Locus mit verschiedenen *Igt*-Genen, einschließlich *IgtB* und *gtE*, und seine Sequenz sind in der Technik bekannt (siehe M. P. Jennings et al., *Microbiology* 1999, 145, 3013–3021 und darin zitierten Referenzen, und *J. Exp. Med.* 180: 2181–2190 [1994]).

[0150] Soll Vollängen-(nicht-abgeschnittenes)LOS verwendet werden, ist es für LOS wünschenswert, nicht sialyliert zu werden (da solches LOS eine Immunantwort gegen die gefährlichsten, invasiven Meningokokken B-Stämme hervorruft, die auch unsialyliert sind). In einem solchen Fall ist die Verwendung eines kapselnegativen Stamms, der ein gelöscht *synA* (entspricht *synX* und *siaA*), *synB* (entspricht *siaB*) oder *synC* (entspricht *siaC*) Gen hat, vorteilhaft, da so eine Mutation auch *menB* LOS unfähig dazu macht, sialyliert zu werden.

[0151] In Bleb-Zubereitungen, insbesondere in Zubereitungen, die mit niedrigen DOC-Konzentrationen extrahiert werden, kann LPS als Antigen in der immunogenen Zusammensetzung der Erfindung verwendet werden. Es ist jedoch vorteilhaft die enzymatische Funktion entweder der *IgtE*, *IgtA* (insbesondere in Kombination mit *IgtC*), oder, bevorzugt, *IgtB* Gene/Genprodukte zur Entfernung von human-ähnlichen Lacto-N-neotetraosestrukturen herunterzuregulieren/zu deletieren/zu deaktivieren. Der *Neisseria*-Locus (und Sequenzen davon), der die *Igt*-Gene für die Biosynthese der LPS-Oligosaccharidstruktur enthält, ist im Stand der Technik bekannt (Jennings et al., *Microbiology* 1999 145; 3013–3021 und dort zitierte Literatur; und *J. Exp. Med.* 180: 2181–2190 [1994]). Herunterregulierung/Deletion von *IgtB* (oder des funktionellen Genprodukts) ist bevorzugt, da es das schützende LPS-Epitop intakt lässt.

[0152] In erfindungsgemäßen *N. meningitidis* Serogruppe B-Bleb-Zubereitungen ist die Herunterregulierung/Deletion beider *siaD* und *IgtB* bevorzugt, (obwohl eine Kombination aus *IgtB*⁻ mit jedem *ctrA*⁻, *ctrB*⁻, *ctrC*⁻, *ctrD*⁻, *synA*⁻ (äquivalent zu *synX*⁻ und *siaA*⁻), *synB*⁻ (äquivalent zu *siaB*⁻) oder *synC*⁻ (äquivalent zu *siaC*⁻) in einem Meningokokken B-Bleb-Produktionsstamm auch verwendet werden kann), was zu einer Bleb-Zubereitung mit optimaler Sicherheit und Erhalt des schützenden LPS-Epitops führt.

[0153] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist daher eine immunogene Bleb-Zubereitung wie oben beschrieben, die aus einem solchen kombinierten Mutanten-Stamm von Meningokokkus B abgeleitet ist. Der Stamm selbst ist ein weiterer Aspekt der Erfindung.

[0154] Die immunogene Zusammensetzung der Erfindung kann wenigstens ein, zwei, drei, vier oder fünf verschiedene Zubereitungen von Vesiken der äußeren Membran enthalten. Sind zwei oder mehr OMV-Zubereitungen enthalten, ist mindestens ein Antigen der Erfindung in jedem OMV hochreguliert. Solche OMV-Zubereitungen können von *Neisseria*-Stämmen der gleichen Spezies und Serogruppe oder bevorzugt aus *Neisseria*-

Stämmen verschiedener Klassen, Serogruppen, Serotypen, Subserotypen oder Immunotypen abgeleitet werden. Zum Beispiel kann eine immunogene Zusammensetzung eine oder mehrere Zubereitung(en) von Vesikeln der äußeren Membran umfassen, die LPS vom Immunotyp L2 enthalten, und eine oder mehrere Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran, die LPS von Immunotyp L3 enthalten. L2 oder L3 OMV-Zubereitungen werden vorzugsweise aus einem stabilen Stamm abgeleitet, der minimale Phasenvariabilität im LPS-Oligosaccharidsynthese-Genlocus aufweist.

Vesikel der äußeren Membran, die mit Zusammensetzungen aus Untereinheiten kombiniert sind

[0155] Die erfindungsgemäßen immunogenen Zusammensetzungen können sowohl Zusammensetzungen aus Untereinheiten als auch Vesikel der äußeren Membran enthalten. Es gibt mehrere Antigene, die aufgrund ihrer Löslichkeit besonders für die Aufnahme in eine Zusammensetzung aus Untereinheiten geeignet sind. Beispiele für solche Proteine schließen ein: FhaB, NspA, Hsf Passenger-Domäne, Hap Passenger Domäne, AspA Passenger Domäne, AspA, OMP85, FrpA, FrpC, TbpB, LbpB, PilQ. Die Zubereitung von Vesikeln der äußeren Membran hätte mindestens ein verschiedenes Antigen, ausgewählt aus der folgenden Liste, welches rekombinant im Vesikel der äußeren Membran hochreguliert worden ist: NspA, Hsf, Hap, OMP85, TbpA (hoch), TbpA (niedrig), LbpA, TbpB, LbpB, NadA, TspA, TspB, PilC, PilQ, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, MafA, MafB und PldA; und enthält gegebenenfalls eine oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3.

Spezifische immunogene Zusammensetzungen der Erfindung

[0156] In den unten aufgeführten spezifischen Kombinationen sollten die oben beschriebenen Kombinationen von Antigenen hochreguliert werden, wenn Kombinationen von Antigenen in einem Bleb vorliegen.

[0157] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst ein Autotransporter-Protein und ein Eisenaufnahme-Protein, besonders bevorzugt Hsf und TbpA (hoch) und/oder TbpA (niedrig). Solche immunogenen Zusammensetzungen können bevorzugt weiterhin mindestens eines aus OMP 85, FrpA, FrpC, LbpA, LbpB, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, TspA, NadA, TspB, PilQ, FhaC, NspA, PldA, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, FhaB, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, VapD und Hap umfassen. Alle oben genannten immunogenen Zusammensetzungen können ferner einen oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3 umfassen.

[0158] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst Hsf und mindestens ein weiteres Antigen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, P2086, HpuA, HpuB, Lipo28, SibP, Hap, AspA, IgA Protease, OMP85, NspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, FhaC, NadA, PldA, TspA, TspB, TdfH, PorB und FhaB. Alle oben genannten immunogenen Zusammensetzungen können ferner einen oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3 umfassen. Bevorzugte Kombinationen umfassen Hsf und OMP85 (wahlweise mit einem oder mehreren aus Hap, FrpA oder LbpB); Hsf und Hap (wahlweise mit einem oder mehreren aus FrpA, LbpB oder OMP85); Hsf und FrpA (wahlweise mit einem oder mehreren aus Hap, LbpB oder OMP85); Hsf und LbpB (wahlweise mit einem oder mehreren aus Hap, OMP85 oder FrpA). Insoweit Hsf ein Adhäsion und ein Autotransporter-Protein ist, umfasst eine besonders bevorzugte Kombination Hsf, OMP85, TbpA, LPS Immunotyp L2 und/oder L3, vorzugsweise in einer multivalenten Bleb-Zubereitung, in der Mitglieder aller fünf Gruppen von Antigenen vertreten sind. Vorzugsweise sind sowohl TbpA (niedrig) als auch TbpA (hoch) vorhanden.

[0159] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst FhaB und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NM60964, NMB0293, TdfH, PorB, PldA, Hap, IgA Protease, AspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA und TspB und einen oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3. Bevorzugte Kombinationen umfassen FhaB und Hsf (wahlweise mit einem oder mehreren von OMP85, LbpB, Hap oder FrpA); FhaB und OMP85 (wahlweise mit einem oder mehreren von LbpB, Hap oder FrpA); FhaB und LbpB (wahlweise mit einem oder mehreren von Hap oder FrpA); FhaB und Hap (optional mit FrpA). Eine bevorzugte Kombination umfasst FhaB, LbpB, Hsf (als OMP) und FrpA, wobei Mitglieder aller fünf Gruppen von Antigenen vertreten sind.

[0160] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst NspA und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, OMP85, PilQ, AspA, IgA Protease, NadA, PldA, Hsf, Hap, TspA, TspB, TdfH, PorB, und einen oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3. Bevorzugte Kombinationen umfassen NspA und Hsf (wahlweise mit einem oder mehreren aus OMP85, Hap, LbpA

oder TbpA); NspA und OMP85 (wahlweise mit einem oder mehreren aus Hap, LbpA oder TbpA); NspA und Hap (wahlweise mit einem oder mehreren aus LbpA oder TbpA); NspA und LbpA (wahlweise mit TbpA. Eine besonders bevorzugte Kombination besteht aus NspA, Hsf, TbpA, LPS Immuntyp L2 und/oder L3, vorzugsweise in einer multivalenten Bleb-Zubereitung, in der Mitglieder aller fünf Gruppen von Antigenen vertreten sind. Vorzugsweise sind beide TbpA (niedrig) und TbpA (hoch) vorhanden.

[0161] Immunogene Zusammensetzungen mit individualisierten Kombinationen von Antigenen, die in WO 00/25811 offenbart sind, werden in der vorliegenden Erfindung nicht beansprucht. Vorzugsweise sind immunogene Zusammensetzungen oder Impfstoffe nicht von der vorliegenden Erfindung abgedeckt, wenn sie einen Antigengehalt haben, der ausschließlich aus Transferrin-Bindungsprotein und NspA besteht (oder im Falle eines Bleb-Impfstoffs, einen hochregulierten oder angereicherten Antigengehalt haben, der ausschließlich aus Transferrin-Bindungsprotein und NspA besteht), jedoch können bestimmte Kombinationen von Antigenen (oder hochregulierten Antigenen), bestehend aus oder umfassend NspA, sowie sowohl TbpA (hoch), als auch TbpA (niedrig), mit umfasst sein. Wahlweise werden Zusammensetzungen oder Impfstoffe, die eine Kombination (Subunit) oder Hochregulierung (Bleb) von Transferrin-Bindungsprotein und NspA enthalten, nicht beansprucht.

[0162] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst NadA und mindestens ein weiteres Antigen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, OMP85, NspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, HpuA, HpuB, AspA, IgA Protease, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB und einen oder beide der LPS Immuntypen L2 und L3.

[0163] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst OMP85 und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, IgA Protease, AspA, Hsf, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, PilQ, TdfH, PorB und FhaB und einen oder beide der LPS Immuntypen L2 und L3. Bevorzugte Kombinationen umfassen OMP85 und Hsf (wahlweise mit einer oder beiden der LbpA oder NspA); OMP85 und LbpA (wahlweise mit einer oder beiden der Hap und NspA); OMP85 und Hap (optional mit NspA).

[0164] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst Hap und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, NspA, IgA Protease, AspA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB und FhaB und einen oder beide der LPS Immuntypen L2 und L3.

[0165] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst FrpA und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo 28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, IgA Protease, AspA, NadA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB 0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB und FhaB und einen oder beide der LPS Immuntypen L2 und L3.

[0166] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst FrpC und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo 28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, IgA Protease, AspA, NadA, FhaB, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB und FhaB und einen oder beide der LPS Immuntypen L2 und L3.

[0167] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst einen oder beide der LPS Immuntypen L2 und L3 und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, IgA Protease, AspA, NadA, FhaB, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB und FhaB.

[0168] Bevorzugte Kombinationen von Antigenen in einer erfindungsgemäßen immunogenen Zusammensetzung umfassen Kombinationen, umfassend ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und FhaB; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und PilC; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und NadA; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und FrpA; ein Eisenaufnah-

me-Protein, ein Autotransporter-Protein und PilQ; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und TspA; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und TspB; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und NspA; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und FrpC; bevorzugter umfassen sie ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und Hap; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und FrpA/C; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und LbpB; ein Eisenaufnahme-Protein, ein Autotransporter-Protein und OMP85 (D15). Am meisten bevorzugt würde OMP 85 (D15) als Teil einer Zubereitung des Vesikels der äußeren Membran mit einbezogen werden.

[0169] In immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung, die LPS enthalten, ist LPS vorzugsweise an eine Quelle von T-Helfer-Epitopen konjugiert, vorzugsweise an Proteine, und im Fall von LPS in OMVs, vorzugsweise an Proteine der äußeren Membran. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform enthält LPS, das in situ (vorzugsweise intra-Bleb) an OMP der Zubereitung von Vesikeln der äußeren Membran mit OMP konjugiert wurde (zum Beispiel wie oben beschrieben).

[0170] Die immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung können Antigene enthalten (Proteine, LPS und Polysaccharide), die von *Neisseria meningitidis* Serogruppen A, B, C, Y, W-135, oder *Neisseria gonorrhoeae* abgeleitet sind.

[0171] Vorzugsweise bestehen und/oder umfassen die immunogenen Zusammensetzungen oder Impfstoffe der Erfindung nicht die spezifischen Kombinationen der SEQ IDs, die in der Tabelle ab Seite 3, Zeile 18, bis Seite 52, Zeile 2 der WO 00/71725 aufgeführt sind, und/oder jede einzelne Kombination, die in den Beispielen 1–11 der WO 00/71725 beschrieben ist.

[0172] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst TbpA (niedrig) und mindestens ein weiteres Antigen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, IgA Protease, NspA, HpuA, HpuB, Hap, OMP85, NspA (wenn es desweiteren mit TbpA (hoch) kombiniert wird), PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, AspA, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB und FhaB und einen oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3. Bevorzugte Kombinationen umfassen TbpA (niedrig) und Hsf und LbpA; TbpA (niedrig) und OMP85 (wahlweise mit einem oder beiden aus LbpA und Hap); TbpA (niedrig) und LbpA und Hap.

[0173] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst TbpA (hoch) und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, Hap, OMP85, NspA (wenn es desweiteren mit TbpA (niedrig) kombiniert wird), PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, MafA, MafB, AspA, IgA Protease, PldA, FhaB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB und FhaB, und entweder einen oder beide LPS Immunotypen L2 und L3. Bevorzugte Kombinationen umfassen TbpA (hoch) und Hsf und LbpA; TbpA (hoch) und OMP85 (wahlweise mit einem oder beiden der LbpA und Hap); TbpA (hoch) und LbpA und Hap.

[0174] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst LbpA und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, IgA Protease, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB und FhaB und einen oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3. Bevorzugte Kombinationen umfassen LbpA und Hsf (optional mit Hap).

[0175] Eine weitere immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst LbpB und mindestens ein weiteres Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpA, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, IgA Protease, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB und FhaB und einen oder beide der LPS Immunotypen L2 und L3. Bevorzugte Kombinationen umfassen LbpB und Hsf (wahlweise mit einem oder mehreren aus OMP85, Hap oder FrpA); LbpB und OMP85 (wahlweise mit einem oder mehreren aus Hap oder FrpA); LbpB und Hap (wahlweise mit FrpA).

[0176] Vorzugsweise wird keine individualisierte Kombination, die in WO 01/52885 offenbart ist, in der vorliegenden Erfindung beansprucht.

Weitere Kombinationen

[0177] Die immunogene Zusammensetzung der Erfindung kann ferner bakterielle Kapsel-Polysaccharide oder bakterielle Kapsel-Oligosaccharide umfassen. Die Kapsel-Polysaccharide oder Kapsel-Oligosaccharide können von einem oder mehreren der folgenden abgeleitet werden: *Neisseria meningitidis* der Serogruppe A, C, Y und/oder W-135, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, Streptokokken der Gruppe A, Streptokokken der Gruppe B, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*.

[0178] Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Impfstoffkombinationen, die eine antigene Zusammensetzung der Erfindung mit anderen Antigenen umfassen, die vorteilhaft gegen bestimmte Erkrankungen einschließlich solcher verwendet werden, die mit viralen oder Gram-positiven Bakterien assoziiert sind.

[0179] In einer bevorzugten Kombination werden die antigenen Zusammensetzungen der Erfindung mit 1, 2, 3 oder vorzugsweise allen 4 der folgenden Meningokokken-Kapsel-Polysaccharide oder Meningokokken-Kapsel-Oligosaccharide formuliert, die einzeln, oder mit einem Proteinträger konjugiert sein können: A, C, Y oder W-135. Vorzugsweise werden die immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung mit A und C formuliert; oder C; oder C und Y. Ein solcher Impfstoff, der Proteine aus *N. meningitidis* enthält, vorzugsweise der Serogruppe B, kann vorteilhaft als globaler Meningokokken-Impfstoff verwendet werden.

[0180] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die antigenen Zusammensetzungen der Erfindung vorzugsweise mit 1, 2, 3 oder allen 4 der einfachen, oder konjugierten Meningokokken-Kapsel-Polysaccharide oder Meningokokken-Kapsel-Oligosaccharide A, C, Y oder W-135 (wie oben beschrieben) formuliert, mit einem konjugierten *H. influenzae* b Kapsel-Polysaccharid oder Kapsel-Oligosaccharide und/oder einem oder mehreren einfachen oder konjugierten Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid oder Pneumokokken-Kapsel-Oligosaccharide formuliert. Wahlweise kann der Impfstoff auch eine oder mehrere Proteinantigene umfassen, die einen Wirt gegen *Streptococcus pneumoniae*-Infektion schützen können. Ein solcher Impfstoff kann vorteilhaft als globaler Meningitis-Impfstoff verwendet werden.

[0181] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße immunogene Zusammensetzung mit Kapsel-Polysacchariden oder Kapsel-Oligosacchariden, die von einem oder mehreren von *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, Streptokokken der Gruppe A, Streptokokken der Gruppe B, *Staphylococcus aureus* oder *Staphylococcus epidermidis* abgeleitet sind, formuliert. Die Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid-Antigene sind vorzugsweise ausgewählt aus Serotypen 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F und 33F (am meisten bevorzugt aus Serotypen 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F und 23F). Eine weitere bevorzugte Ausführungsform würde die PRP-Kapsel-Polysaccharide von *Haemophilus influenzae* enthalten. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform würde die Typ 5, Typ 8 oder 336 Kapsel-Polysaccharide von *Staphylococcus aureus* enthalten. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform würde die Typ I, Typ II oder Typ III Kapsel-Polysaccharide von *Staphylococcus epidermidis* enthalten. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform würde die Typ Ia, Typ Ic, Typ II oder Typ III Kapsel-Polysaccharide von Streptokokken der Gruppe B enthalten. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform würde die Kapsel-Polysaccharide der Streptokokken der Gruppe A, vorzugsweise weiter umfassend mindestens ein M Protein und noch bevorzugter mehrere Typen von M Proteinen, enthalten.

[0182] Solche Kapsel-Polysaccharide der Erfindung können unkonjugiert sein, oder mit einem Trägerprotein wie Tetanus Toxoid, Tetanus Toxoid Fragment C, Diphtherie Toxoid, CRM197, Pneumolysin, Protein D (US 6342224) konjugiert sein. Das Polysaccharidkonjugat kann durch jede bekannte Kopplungstechnik hergestellt werden. Zum Beispiel kann das Polysaccharid über eine Thioetherbindung gekoppelt werden. Dieses Konjugationsverfahren basiert auf der Aktivierung des Polysaccharids mit 1-Cyano-4-dimethylamino Pyridinium Tetrafluoroborat (CDAP), um einen Cyanatester zu bilden. Das aktivierte Polysaccharid kann somit direkt oder über eine Spacergruppe mit einer Aminogruppe auf dem Trägerprotein gekoppelt werden. Vorzugsweise wird der Cyanatester mit Hexandiamine gekoppelt, und das aminoderivatisierte Polysaccharid wird an das Trägerprotein unter Verwendung von Heteroligationschemie und Bildung der Thioether Bindung konjugiert. Solche Konjugate werden in der veröffentlichten PCT Anmeldung WO 93/15760 Uniformed Services University beschrieben.

[0183] Die Konjugate können auch durch Verfahren der direkten reduktiven Aminierung hergestellt werden, wie sie in US 4365170 (Jennings) und US 4673574 (Anderson) beschrieben werden. Andere Verfahren sind in der EP-0-161-188, EP-208375 und EP-0-477508 beschrieben. Ein weiteres Verfahren beinhaltet die Kopplung eines Bromcyan-aktivierten Polysaccharids, das mit Adipinsäuredihydrazid (ADH) an den Proteinträger durch

Carbodiimid-Kondensation derivatisiert ist (Chu C. et al., *Infect. Immunity*, 1983, 245–256). Sind Oligosaccharide enthalten, ist es bevorzugt, dass sie konjugiert sind.

[0184] Bevorzugte Pneumokokken-Proteinantigene sind jene Pneumokokken-Proteine, die auf der äußeren Oberfläche des Pneumokokken exponiert sind (die in der Lage sind, während zumindest eines Teils des Lebenszyklus des Pneumokokken von dem Immunsystem eines Wirtes erkannt zu werden), oder sind Proteine, die vom Pneumokokken sekretiert werden, oder freigegeben werden. Am bevorzugtesten ist das Protein ein Toxin, Adhäsion, 2-Komponenten Signalüberträger oder Lipoprotein von *Streptococcus pneumoniae*, oder Fragmente davon. Besonders bevorzugte Proteine beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf: Pneumolysin (vorzugsweise durch chemische Behandlung oder Mutation entgiftet) [Mitchell et al., *Nucleic Acids Res.* 1990 Jul 11; 18 (13): 4010 "Comparison of Pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.", Mitchell et al., *Biochim Biophys Acta* 1989 Jan 23; 1007 (1): 67–72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties.", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton et al), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA und transmembrane Deletionsvarianten davon (US 5804193 Briles et al); PspC und transmembrane Deletionsvarianten davon (WO 97/09994 – Briles et al); PsaA und transmembrane Deletionsvarianten davon (Berry & Paton, *Infect Immun* 1996 Dec; 64 (12): 5255–62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); cholinbindende Proteine aus Pneumokokken und transmembrane Deletionsvarianten davon; CbpA und transmembrane Deletionsvarianten davon (WO 97/41151; WO 99/51266); Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*Infect. Immun.* 1996 64: 3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato et al., *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164: 207–14); M ähnliches Protein, (EP 0837130) und Adhäsion 18627, (EP 0834568). Weitere bevorzugte Pneumokokken Proteinantigene sind in der WO 98/18931 offenbart, insbesondere die, welche in WO 98/18930 und PCT/US99/30390 ausgewählt sind.

[0185] Die immunogene Zusammensetzung/der Impfstoff der Erfindung kann gegebenenfalls auch Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran umfassen, die aus anderen Gram-negativen Bakterien, wie beispielsweise *Moraxella catarrhalis* oder *Haemophilus influenzae*, hergestellt sind.

Moraxella catarrhalis Bleb-Zubereitungen

[0186] Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können ferner OMV-Zubereitungen enthalten, die von *Moraxella catarrhalis* abgeleitet sind. Konstruierte OMV-Zubereitungen können von *Moraxella catarrhalis*, wie in WO 01/09350 beschrieben, abgeleitet werden. Eines oder mehrere der folgenden Gene (die schützende Antigene kodieren) werden für die Hochregulierung bevorzugt: OMP106 (WO 97/41731 & WO 96/34960), HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85 (PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977.2), lipo10 (GB 9918208.1), lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038), ompCD, CopB (Helminen ME, et al., (1993) *Infect. Immun.* 61: 2003–2010), D15 (PCT/EP99/03822), OmpIA1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), LbpA und LbpB (WO 98/55606), TbpA und TbpB (WO 97/13785 & WO 97/32980), OmpE, UspA1 und UspA2 (WO 93/03761) und Omp21. Sie werden auch als Gene bevorzugt, die heterolog in andere Gram-negative Bakterien eingeführt werden können.

[0187] Eines oder mehrere der folgenden Gene sind für die Herunterregulierung bevorzugt: CopB, OMP106, OmpBI, TbpA, TbpB, LbpA und LbpB.

[0188] Eines oder mehrere der folgenden Gene sind für die Herunterregulierung bevorzugt: htrB, msbB und lpxK.

[0189] Eines oder mehrere der folgenden Gene sind für die Hochregulierung bevorzugt: pmrA, pmrB, pmrE, und pmrF.

Haemophilus influenzae Bleb-Zubereitungen

[0190] Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können ferner OMV-Zubereitungen enthalten, die von *Haemophilus influenzae* abgeleitet sind. Konstruierte OMV-Präparate können aus *Haemophilus influenzae*, wie in WO 01/09350 beschrieben, abgeleitet werden. Eines oder mehrere der folgenden Gene (die schützende Antigene kodieren) werden für die Hochregulierung bevorzugt: D15 (WO 94/12641), P6 (EP 281673), TbpA (WO 96/40929; WO 95/13370), TbpB (WO 96/40929; WO 95/13370), P2, P5 (WO 94/26304), OMP26 (WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hsf, Hap, Hin47 und Hif (alle Gene in diesem Operon sollten hochreguliert werden, um Pilin hochzuregulieren). Sie werden auch als Gene bevorzugt, die heterolog in andere Gram-negative Bakterien eingeführt werden können.

[0191] Eines oder mehrere der folgenden Gene sind für die Herunterregulierung bevorzugt: P2, P5, Hif, IgA1-Protease, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, htrB, msbB und lpxK.

[0192] Eines oder mehrere der folgenden Gene sind für die Hochregulierung bevorzugt: pmrA, pmrB, pmrE, und pmrF.

[0193] Die immunogene Zusammensetzung/der Impfstoff der Erfindung kann wahlweise auch Antigene enthalten, die einen Schutz gegen eine oder mehrere aus Diphtherie, Tetanus und Bordetella pertussis Infektionen bieten. Die Pertussis-Komponente kann getötete, ganzzellige *B. pertussis* (Pw) oder azelluläre Pertussis (Pa) sein, die mindestens ein Antigen (vorzugsweise 2 oder alle 3) von PT, FHA und 69 kDa Pertactin enthält. Normalerweise würden die Antigene, die Schutz gegen Diphtherie und Tetanus bieten, Diphtherie Toxoid und Tetanus Toxoid sein. Die Toxide können chemisch inaktivierte Toxine sein, oder Toxine, die durch die Einführung von Punktmutationen inaktiviert wurden.

[0194] Die immunogene Zusammensetzung/der Impfstoff kann wahlweise auch ein oder mehrere Antigene enthalten, die einen Wirt gegen nicht typisierbaren *Haemophilus influenzae*, RSV schützen können und/oder ein oder mehrere Antigene, die einen Wirt gegen Grippe schützen können. Ein solcher Impfstoff kann vorteilhaft als globaler Otitis media-Impfstoff verwendet werden.

[0195] Bevorzugte nicht typisierbare *H. influenzae* Proteinantigene umfassen Fimbrin Protein (US 5766608) und Fusionen, die Peptide daraus umfassen (z. B. LB1 Fusion) (US 5843464 – Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, Protein D, TbpA, TbpB, Hia, Hmwl, Hmw2, Hap und D15.

[0196] Bevorzugte Influenzavirus-Antigene umfassen ganzen, lebenden oder inaktivierten Virus, Split Influenza Virus, der in Eiern oder MDCK Zellen oder in Vero-Zellen oder in ganzen Grippevirosomen gezüchtet wurde (wie von R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915–920 beschrieben), oder gereinigte oder rekombinante Proteine davon, wie HA, NP, NA, oder M Proteine, oder Kombinationen davon.

[0197] Bevorzugte RSV (Respiratory Syncytial Virus) Antigene umfassen das F-Glykoprotein, das G-Glykoprotein, das HN-Protein, das M-Protein, oder Derivate davon.

[0198] Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können Proteine von *Moraxella catarrhalis* umfassen wie TbpA (WO 97/13785; WO 99/52947), TbpB (WO 97/13785; WO 99/52947; Mathers et al., FEMS Immunol Med Microbiol 1997 19; 231–236; Myers et al., Infect Immun 1998 66; 4183–4192), LbpA, LbpB (Du et al., Infect Immun 1998 66; 3656–3665), UspA1, UspA2 (Aebi et al., Infect Immun 1997 65; 4367 bis 4377), OMP 106 (US 6214981), Ton-B abhängiger Rezeptor (WO 00/78968), CopB (Sethi et al., Infect. Immun. 1997 65; 3666–3671) und HasR Rezeptor (WO 00/78968); Proteine von *Haemophilus influenzae* schliessen HMW ein (St Geme et al., Infect Immun 1998 66; 364–368), Hia (St Geme et al., J. Bacteriol. 2000 182; 6005–6013), TbpI (WO 96/40929; WO 95/13370), Tbp2 (WO 96/40929; WO 95/13370; Grau-Owen et al Infect Immun 1995 63; 1201–1210), LbpA, LbpB (Schryvers et al., 1989, 29: 121–130), HasR, TonB-abhängiger Rezeptor (Fleishmann et al., Science 1995 269; 496–512), Hämoglobin-bindendes Protein, HhuA (Cope et al., Immun 2000 68 Infect; 4092–4101), HgpA (Maciver et al., Infect Immun 1996 64; 3703–3712), HgbA, HgbB und HgbC (Jin et al., Infect Immun 1996 64; 3134–3141), HxuA (Cope et al., Mol Microbiol 1994 13; 863–873), HxuC (Cope et al., Infect Immun 2001 69; 2353–2363); Proteine aus *Neisseria meningitidis* schliessen TbpI, Tbp2, FbpA, FbpB, BfrA und BfrB (Tettelin et al., Science 2000 287; 1809–1815), LbpA, LbpB und HmbR ein.

Impfstoff-Formulierungen

[0199] Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist die Formulierung der immunogenen Zusammensetzung der Erfindung in einem Impfstoff, der auch einen pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoff oder Träger umfassen kann.

[0200] Die Herstellung der Vesikelzubereitungen der äußeren Membran aus einem der oben genannten modifizierten Stämme kann durch jedes dem Fachmann bekannte Verfahren erreicht werden. Vorzugsweise werden die in EP 301992, US 5,597,572, EP 11243 oder US 4,271,147 veröffentlichten Verfahren verwendet. Am meisten bevorzugt wird die Methode, die in WO 01/09350 beschrieben wird, verwendet.

[0201] Die Herstellung von Impfstoffen ist allgemein in Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York) beschrieben.

[0202] Die antigenen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können für die Impfstoffformulierung der Erfindung mit Adjuvant versehen werden. Geeignete Adjuvantien schliessen ein Aluminiumsalz wie Aluminiumhydroxid Gel (Alaun) oder Aluminiumphosphat ein, können aber auch Calciumsalze (insbesondere Calciumcarbonat), Eisen oder Zink sein, oder eine unlösliche Suspension acylierten Tyrosins oder acylierten Zuckers, kationisch oder anionisch derivatisierte Polysaccharide oder Polyphosphazene.

[0203] Geeignete Th1 Adjuvantensysteme, die verwendet werden können, umfassen Monophosphoryllipid A, insbesondere 3-de-O-acyliertes Monophosphoryllipid A, und eine Kombination von Monophosphoryllipid A, vorzugsweise 3-de-O-acyliertes Monophosphoryllipid A (3D-MPL) zusammen mit einem Aluminiumsalz (vorzugsweise Aluminiumphosphat). Ein verbessertes System beinhaltet die Kombination eines Monophosphoryllipids A und eines Saponinderivats, insbesondere die Kombination aus QS21 und 3D-MPL wie in WO 94/00153 offenbart, oder eine weniger reaktogene Zusammensetzung, worin das QS21 mit Cholesterin gequenchet ist, wie in WO 96/33739 offenbart. Eine besonders wirksame Adjuvantformulierung, die QS21 3D-MPL und Tocopherol in einer Öl-in-Wasser Emulsion beinhaltet, ist in WO 95/17210 beschrieben und ist eine bevorzugte Formulierung.

[0204] Der Impfstoff kann ein Saponin, noch bevorzugter QS21 umfassen. Er kann auch eine Öl-in-Wasser Emulsion und Tocopherolumfassen. Oligonukleotide, die unmethylierte CpG enthalten (WO 96/02555), sind ebenfalls bevorzugte Induktoren einer TH1 Antwort und sind für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet.

[0205] Die Impfstoffzusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann dazu verwendet werden, ein Säugtier, das für Infektionen anfällig ist, durch systemische oder mukosale Verabreichung dieses Impfstoffs zu schützen oder zu behandeln. Die Verabreichung kann eine intramuskuläre, intraperitoneale, intradermale oder subkutane Injektion umfassen; oder mukosale Verabreichung über die Oral-/Nahrungs-, Atmungs- oder Urogenitaltrakte. Somit ist ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Immunisierung eines menschlichen Wirtes gegen eine Krankheit, die durch Infektion mit einem Gram-negativen Bakterium verursacht wird, wobei die Methode das Verabreichen einer immunschützenden Dosis der OMV-Zubereitung der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0206] Die Menge an Antigen in jeder Impfstoffdosis wird als eine Menge ausgewählt, die eine immunschützende Reaktion ohne signifikante, negative Nebenwirkungen der typischen Impfstoffe hervorruft. Diese Menge variiert je nachdem, welches spezifische Immunogen eingesetzt wird und wie es präsentiert wird. Im Allgemeinen erwartet man, dass jede Dosis 1–100 µg Proteinantigen oder OMV-Zubereitung, bevorzugt 5–50 µg, und typischerweise im Bereich von 5–25 µg enthält.

[0207] Eine optimale Menge für einen bestimmten Impfstoff kann durch Standardstudien mit Beobachtung geeigneter Immunantworten bei Patienten festgestellt werden. Nach einer ersten Impfung können Testpersonen eine oder mehrere Booster-Immunisierungen in angemessenen Abständen erhalten.

[0208] Die Impfstoffe der Erfindung sind vorzugsweise immunschützend und nicht toxisch und eignen sich für die Verwendung bei Kindern oder Jugendlichen.

[0209] Man versteht unter pädiatrischer Verwendung die Anwendung bei Kleinkindern unter 4 Jahren.

[0210] Man versteht unter immunschützend, dass das SBA und/oder Tier-Schutz-Modell und/oder Adhäsionsblockierungsassay, wie oben beschrieben, zufriedenstellend erfüllt wird.

[0211] Man versteht unter nicht toxisch, dass es nicht mehr als ein zufriedenstellendes Niveau an Endotoxinaktivität im Impfstoff, gemessen durch die bekannten LAL- und Pyrogenizitätsassays, gibt.

Polynukleotide der Erfindung

[0212] "Polynukleotid" bezieht sich im Allgemeinen auf alle Polyribonukleotide oder Polydesoxiribonucleotide, die unveränderte RNA oder DNA, oder modifizierte RNA oder DNA sein können. "Polynukleotide" umfassen ohne Einschränkung einzel- und doppelsträngige DNA, DNA, die eine Mischung aus einzel- und doppelsträngigen Bereichen ist, einzel- und doppelsträngige RNA, und RNA, die eine Mischung aus einzel- und doppelsträngigen Bereichen ist, Hybridmoleküle, die DNA und RNA umfassen, die einzel- oder noch typischer, doppelsträngig, oder eine Mischung aus einzel- und doppelsträngigen Bereichen, sein kann. Darüber hinaus bezeichnet der Begriff "Polynukleotid" dreisträngige Bereiche, die RNA oder DNA, oder sowohl RNA als auch

DNA umfassen. Der Begriff Polynukleotid umfasst auch DNAs oder RNAs, die eine oder mehrere modifizierte Basen enthalten und DNAs oder RNAs, die ein zur Stabilisierung oder aus anderen Gründen modifiziertes Rückgrat haben. "Modifizierte" Basen umfassen zum Beispiel tritylierte Basen und ungewöhnliche Basen wie Inosin. Eine Vielzahl von Modifikationen wurde an DNA und RNA durchgeführt; damit umfasst "Polynukleotid" chemisch, enzymatisch oder metabolisch modifizierte Formen von Polynukleotiden, wie sie typischerweise in der Natur gefunden werden, sowie die für Viren und Zellen charakteristischen chemischen Formen von DNA und RNA. "Polynukleotid" umfasst auch relativ kurze Polynukleotide, die häufig als Oligonukleotide bezeichnet werden.

[0213] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine immunologische/Impfstoffformulierung, die ein oder mehrere Polynukleotid(e) umfasst. Solche Techniken sind im Stand der Technik bekannt, siehe zum Beispiel Wolff et al., Science, (1990) 247: 1465–8.

[0214] Solche Impfstoffe enthalten eine oder mehrere Polynukleotid(e), die eine Vielzahl von Proteinen kodiert, die Kombinationen von Proteinen der oben beschriebenen Erfindung entsprechen.

[0215] Die Expression von Proteinen aus solchen Polynukleotiden wäre unter der Kontrolle eines eukaryotischen Promotors, der die Expression in einer Säugetierzelle steuert. Das Polynukleotid kann zusätzlich Sequenzen umfassen, die andere Antigene kodieren. Beispiele für eukaryontische Promotoren, die die Expression steuern könnten, umfassen virale Promotoren von Viren, einschließlich adenovirale Promotoren, und retrovirale Promotoren. Alternativ könnten Säugetierpromotoren verwendet werden, um die Expression zu steuern.

Weitere Aspekte der Erfindung

[0216] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zum Behandeln oder der Prophylaxe der Neisseria-Krankheit, welches die Verabreichung einer schützenden Dosis (oder wirksamen Menge) des Impfstoffes der Erfindung an einen Wirt, der diesen benötigt, umfasst. Neisseria meningitidis der Serogruppen A, B, C, Y oder W135 und/oder Neisseria gonorrhoeae Infektion könnte in vorteilhafter Weise verhindert oder behandelt werden.

[0217] Die Erfindung umfasst auch eine Verwendung des Impfstoffes der Erfindung in der Herstellung eines Medikaments zum Behandeln oder zur Prophylaxe einer Neisseria-Infektion. Wiederum umfasst Neisseria-Infektion die Infektion durch Neisseria meningitidis der Serogruppen A, B, C, Y, W-135 und/oder Neisseria gonorrhoeae.

[0218] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein gentechnisch hergestellter Neisseria-Stamm, aus dem ein erfindungsgemäßer Vesikel der äußeren Membran (wobei mindestens zwei Proteine der Erfindung wie oben beschrieben rekombinant hochreguliert wurden) abgeleitet werden kann. Solche Neisseria-Stämme können Neisseria meningitidis oder Neisseria gonorrhoeae sein.

[0219] Der Stamm könnte auch so konstruiert worden sein (wie oben beschrieben), dass die Expression von anderen Neisseria-Proteinen herunterreguliert wird, umfassend die Expression von einem, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben oder acht von LgtB, LgtE, Siad, OpC, OpA, PorA, FrpB, msbB und HtrB. Bevorzugte Kombinationen zur Herunterregulierung umfassen Herunterregulierung (vorzugsweise Deletion) von mindestens LgtB und SiaD, Herunterregulierung von mindestens PorA und OpC, Herunterregulierung von mindestens PorA und OpA und Herunterregulierung von mindestens PorA, OpA und OpC.

[0220] Weitere Aspekte der Erfindung sind Verfahren zum Herstellen der immunogenen Zusammensetzung oder des Impfstoffs der Erfindung. Diese umfassen ein Verfahren, das einen Schritt des Vermischens von mindestens zwei isolierten Antigenen oder Proteinen aus Neisseria umfasst, welche in Form von Blebs, die aus den Neisseria-Stämmen der Erfindung abgeleitet sind, vorliegen, um eine immunogene Zusammensetzung der Erfindung herzustellen, und ein Verfahren zum Herstellen des Impfstoffs der Erfindung, welches einen Schritt des Kombinierens der immunogenen Zusammensetzung der Erfindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

[0221] Die Erfindung umfasst auch Verfahren zum Herstellen der immunogenen Zusammensetzung der Erfindung, die einen Schritt zur Isolierung von Vesikeln der äußeren Membran der Erfindung aus einer Neisseria-Kultur umfasst. Solch ein Verfahren kann einen weiteren Schritt der Kombination von mindestens zwei Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran beinhalten, wobei bevorzugt mindestens eine Zubereitung von Vesikeln der äußeren Membran LPS des Immunotyps L2 enthält und mindestens eine Zubereitung von Vesikeln

keln der äußeren Membran LPS des Immunotyps L3 enthält. Die Erfindung umfasst auch solche Verfahren, bei denen die Vesikel der äußeren Membran durch Extraktion mit einer Konzentration von DOC von 0–0,5% isoliert werden. DOC Konzentrationen von 0,3%–0,5% werden zur Minimierung des LPS Gehalts verwendet. In OMV-Zubereitungen, in denen LPS als ein Antigen konserviert werden soll, werden DOC Konzentrationen von 0–0,3%, vorzugsweise 0,05%–0,2%, am meisten bevorzugt von etwa 0,1% für die Extraktion verwendet.

Ghost oder abgetötete Ganzzellimpfstoffe

[0222] Die Erfinder sehen vor, dass die oben genannten Verbesserungen der Bleb-Zubereitungen und Impfstoffe leicht auf „ghost“ oder abgetötete Ganzzellzubereitungen und Impfstoffe (mit identischen Vorteilen) ausgedehnt werden können. Die modifizierten Gram-negativen Stämme der Erfindung, aus denen die Bleb-Zubereitungen hergestellt werden, können auch zur Herstellung von „ghost“ oder abgetöteten Ganzzellzubereitungen verwendet werden. Verfahren zur Herstellung von „ghost“-Zubereitungen (leere Zellen mit intakten Hüllen) von Gram-negativen Stämmen sind in der Technik gut bekannt (siehe zum Beispiel WO 92/01791). Verfahren zur Tötung ganzer Zellen, um inaktivierte Zellzubereitungen für den Einsatz in Impfstoffen herzustellen, sind ebenfalls bekannt. Die Begriffe „Bleb-[oder OMV-]Zubereitungen“ und „Bleb-[oder OMV-]Impfstoffe“, sowie die in diesem Dokument beschriebenen Verfahren, sind daher respektive für die Begriffe „ghost-Zubereitung“ und „ghost-Impfstoff“, und „abgetötete Ganzzellzubereitung“ und „abgetöteter Ganzzellimpfstoff“, im Sinne dieser Erfindung anwendbar.

Antikörper und passive Immunisierung

[0223] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Herstellen eines Immunglobulin für die Verwendung zur Prophylaxe oder zum Behandeln der Neisseria-Infektion, das die Schritte einer Immunisierung eines Empfängers mit dem Impfstoff der Erfindung und die Isolierung von Immunglobulin vom Empfänger umfasst. Ein mit diesem Verfahren hergestelltes Immunglobulin ist ein weiterer Aspekt der Erfindung. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die Immunglobulin der Erfindung und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst, ist ein weiterer Aspekt der Erfindung, der zum Herstellen eines Medikaments zum Behandeln oder zur Prophylaxe der Neisseria-Krankheit eingesetzt werden könnte. Ein Verfahren zum Behandeln oder zur Prophylaxe der Neisseria-Infektion, das einen Schritt der Verabreichung einer wirksamen Menge der pharmazeutischen Zubereitung der Erfindung an einen Patienten umfasst, ist ein weiterer Aspekt der Erfindung.

[0224] Inokula für die Herstellung polyklonaler Antikörper werden in der Regel durch Dispergieren der antigenen Zusammensetzung in einem physiologisch verträglichen Verdünnungsmittel, wie einer Salzlösung oder anderen Adjuvantien, die für den menschlichen Gebrauch geeignet sind, hergestellt, um eine wässrige Zusammensetzung zu bilden. Eine immunstimulierende Menge an Inokulum wird an ein Säugetier verabreicht und das geimpfte Säugetier wird dann für eine ausreichende Zeit gehalten, um schützende Antikörper durch die antigene Zusammensetzung zu induzieren.

[0225] Die Antikörper können in dem gewünschten Maße durch bekannte Techniken, wie der Affinitätschromatographie (Harlow und Lane Antibodies; A Laboratory Manual 1988), isoliert werden.

[0226] Antikörper können auch Antiserumzubereitungen von einer Vielzahl häufig verwendeter Tiere, wie z. B. Ziegen, Primaten, Eseln, Schweinen, Pferden, Meerschweinchen, Ratten oder Menschen, umfassen. Blut wird von den Tieren abgenommen, und das Serum daraus gewonnen.

[0227] Ein erfindungsgemäß hergestelltes Immunglobulin kann vollständige Antikörper, Antikörperfragmente oder -subfragmente umfassen. Antikörper können vollständige Immunglobuline jeder Klasse, z. B. IgG, IgM, IgA, IgD oder IgE, chimäre Antikörper oder Hybridantikörper mit dualer Spezifität für zwei oder mehrere Antigene der Erfindung sein. Sie können auch Fragmente sein, z. B. F(ab')₂, Fab', Fab, Fv und dergleichen, einschließlich Hybridfragmente. Ein Immunglobulin kann auch natürliche, synthetische oder gentechnisch veränderte Proteine umfassen, die sich wie ein Antikörper durch Bindung an spezifische Antigene unter Bildung eines Komplexes verhalten.

[0228] Ein erfindungsgemäßer Impfstoff kann an einen Empfänger verabreicht werden, der dann die Quelle von Immunglobulin ist, das als Antwort auf den Reiz (Challenge) des spezifischen Impfstoffs hergestellt wird. Ein Subjekt, das so behandelt wird, würde Plasma spenden, aus dem Hyperimmunglobulin über herkömmliche Plasmafraktionierungsmethodik erhalten würde. Das Hyperimmunglobulin würde einem anderen Patienten verabreicht werden, um Resistenz gegen oder Behandlung einer Neisseria-Infektion zu vermitteln. Hyperimmunglobuline der Erfindung sind besonders nützlich zum Behandeln oder zur Prophylaxe von Neisseria-Er-

krankungen bei Säuglingen, immungeschwächten Personen oder wenn die Behandlung erforderlich ist, und das Individuum keine Zeit zur Bildung von Antikörpern als Reaktion auf die Impfung hat.

[0229] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die zwei oder mehr monoklonale Antikörper umfasst (oder Fragmente davon, vorzugsweise humane oder humanisierte), die gegen mindestens zwei Bestandteile der immunogenen Zusammensetzung der Erfindung reaktiv sind, die zum Behandeln oder zur Prophylaxe von Infektionen durch Gram-negative Bakterien, bevorzugt *Neisseria*, noch bevorzugter *Neisseria meningitidis* oder *Neisseria gonorrhoeae*, und am meisten bevorzugt *Neisseria meningitidis* der Serogruppe B, verwendet werden könnten.

[0230] Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten monoklonale Antikörper, die vollständige Immunglobuline jeder Klasse sein können, z. B. IgG, IgM, IgA, IgD oder IgE, chimäre Antikörper oder Hybridantikörper mit Spezifität für zwei oder mehr Antigene der Erfindung. Sie können auch Fragmente sein, z. B. F(ab')₂, Fab', Fab, Fv und dergleichen, einschließlich Hybridfragmente.

[0231] Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern sind in der Technik gut bekannt und können die Fusion von Splenozyten mit Myelomzellen umfassen (Köhler und Milstein 1975 *Nature* 256; 495; *Antibodies – a laboratory manual* Harlow und Lane 1988). Alternativ können monoklonale Fv Fragmente durch Screening einer geeigneten Phagendisplaybibliothek (Vaughan TJ et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16; 535) erhalten werden. Monoklonale Antikörper können durch bekannte Methoden humanisiert oder teilweise humanisiert werden.

[0232] Alle Verweise oder Patentanmeldungen, die in dieser Patentschrift zitiert werden, sind durch Bezugnahme hierin aufgenommen.

[0233] Die Begriffe "umfassend", "umfassen" und "umfasst" können im Sinne der Erfinder hier immer jeweils ersetzt werden durch die Begriffe "bestehend aus", "bestehen aus" und "besteht aus".

Verfahren zur industriellen Anwendung der Erfindung

[0234] Die folgenden Beispiele werden unter Verwendung von Standardtechniken durchgeführt, die dem Fachmann allgemein bekannt und für ihn Routine sind, soweit nichts anderes im Detail beschrieben wird. Die Beispiele dienen der Veranschaulichung, schränken die Erfindung aber nicht ein.

Beispiel 1: Verfahren zur Konstruktion von Stämmen von *Neisseria meningitidis* der Serogruppe B, die in Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran verwendet werden

[0235] WO 01/09350 offenbart detaillierte Verfahren zum Herstellen von Vesikeln der äußeren Membran und zur Manipulation der Bakterienstämme, von denen die Vesikel der äußeren Membran abgeleitet sind. Sollen die Vesikel der äußeren Membran Lipoproteine wie TbpB und oder Lipopolysaccharide beibehalten, sind Verfahren zur Isolierung mit niedrigen Mengen oder ohne Desoxycholat bevorzugt.

Beispiel 2: Hochregulierung des Hsf Proteinantigens in einem rekombinanten *Neisseria meningitidis* Serogruppe B-Stamm, dem die funktionellen cps Gene fehlen, der jedoch PorA exprimiert.

[0236] Wie in den Beispielen der WO 01/09350 beschrieben, kann die Anwesenheit von PorA in Vesikeln der äußeren Membran in bestimmten Ländern vorteilhaft sein, und kann die Wirksamkeit des Impfstoffs von rekombinanten verbesserten Blebs erhöhen. Im folgenden Beispiel haben wir einen modifizierten pCMK(+) Vektor verwendet, um die Expression des Hsf Proteinantigens in einem Stamm, dem funktionelle cps Gene fehlen, der aber PorA exprimiert, hochzuregulieren. Der ursprüngliche pCMK(+) Vektor enthält einen chimären porA/lacO Promotor, der im *E. coli* Wirt unterdrückt ist und lacI^q exprimiert, jedoch transkriptionell aktiv in *Neisseria meningitidis* ist. Im modifizierten pCMK(+) wurde der native porA Promotor verwendet, um die Transkription des hsf Gens zu steuern. Das Gen, das Hsf kodiert, wurde unter Verwendung von HSF 01-NdeI und HSF 02-NheI Oligonukleotidprimer, die in der Tabelle unten dargestellt sind, PCR amplifiziert. Aufgrund der Sequenz des HSF 01-NdeI Primers wird das exprimierte HSF-Protein zwei Methioninreste am 5'-Ende enthalten. Die Bedingungen, die für die PCR Amplifikation verwendet wurden, waren die vom Hersteller beschrieben (HiFi DNA Polymerase, Boehringer Mannheim, GmbH). Thermisches Cycling war das Folgende: 25 mal (94°C 1 Min., 48°C 1 Min., 72°C 3 Min.) und 1 Mal (72°C 10 Min., 4°C bis zur Rückgewinnung). Die entsprechenden Amplikons wurde anschließend in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCMK(+) Einschleus(delivery)-Vektors kloniert. In diesem rekombinanten Plasmid, genannt pCMK(+)-Hsf, haben wir lacO, das im chi-

mären *porA/lacO* Promotor vorhanden ist, durch eine rekombinante PCR Strategie deletiert. Das pCMK(+)-Hsf Plasmid wurde als Matrize zur PCR Amplifizierung von 2 separaten DNA Fragmenten verwendet:

- Fragment 1 enthält den *porA* 5' recombinogenen Bereich, das Kanamycin resistente Gen und den *porA* Promotor. Oligonukleotid Primer, die verwendet wurden, RP1 (*SacII*) und RP2, sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt. RP1 Primer ist homolog zu der vom *lac* Operator upstream gelegenen Sequenz.
- Fragment 2 enthält die Shine-Dalgarno Sequenz aus dem *porA* Gen, dem *hsf* Gen und dem *porA* 3' rekombinogenen Bereich. Die verwendeten Oligonukleotid Primer RP3 und RP4(*Apal*) sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt. RP3 Primer ist homolog zu der direkt downstream gelegenen Sequenz des *lac* Operators. Das 3' Ende des Fragments 1 und das 5' Ende des Fragments 2 haben 48 überlappende Basen. 500 ng von jedem PCR (1 und 2) wurden für eine letzte PCR Reaktion verwendet, wobei die Primer RP1 und RP4 verwendet wurden. Das zuletzt erhaltene Amplikon wurde im pSL1180 Vektor, der mit *SacII* und *Apal* geschnitten wurde, subkloniert. Das modifizierte Plasmid pCMK(+)-Hsf wurde in großem Maßstab unter Verwendung des QIAGEN Maxiprep Kits gereinigt und 2 µg dieses Materials wurden dazu verwendet, einen Stamm der *Neisseria meningitidis* Serogruppe B zu transformieren, dem funktionelle *cps* Gene fehlen. Um die Expression von *porA* beizubehalten, wurde die sich aus einem einzigen Crossing-over ergebende Integration durch eine Kombination von PCR und Western-Blot Screening Verfahren ausgewählt. Kanamycin resistente Klone, die positiv durch *porA*-spezifisches PCR und Western-Blot getestet wurden, wurden bei –70°C als Glycerin-Vorrat aufbewahrt und für weitere Studien verwendet. Bakterien (entsprechend ca. $5 \cdot 10^8$ Bakterien) wurden in 50 µl von PAGE-SDS Puffer resuspendiert, dreimal gefroren (–20°C)/gekocht (100°C) und dann durch PAGE-SDS Elektrophorese auf einem 12,5%-Gel aufgetrennt. Die Expression von Hsf wurde in Bakterienlysaten aus ganzen Zellen untersucht (WCBL), die aus NmB, [Cps–, PorA+] oder NmB [CPS–, PorA+, Hsf+] abgeleitet waren. Durch Coomassie Färbung wurde ein signifikanter Anstieg in der Expression von Hsf detektiert (in Bezug auf den endogenen Hsf-Spiegel). Dieses Ergebnis bestätigt, dass der modifizierte pCMK(+)-Hsf Vektor funktionell ist und erfolgreich zur Hochregulierung der Expression von Proteinen der äußeren Membran eingesetzt werden kann, ohne dass die Herstellung der wichtigsten PorA Protein-Antigene der äußeren Membran darunter leidet.

[0237] Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet werden

Oligonukleotide	Sequenz	Anmerkung(en)
Hsf 01-Nde	5'- GGA ATT CCA TAT GAT GAA CAA AAT ATA CCG C-3'	<i>NdeI</i> Klonierungsstelle

Hsf 02-Nhe	5'-GTA GCT AGC TAG CTT ACC ACT GAT AAC CGA C-3'	<i>NheI</i> Klonierungsstelle
GFP-mut-Asn	5'-AAC TGC AGA ATT AAT ATG AAA GGA GAA GAA CTT TTC- 3'	<i>AsnI</i> Klonierungsstelle kompatibel mit <i>NdeI</i>
GFP-Spe	5'-GAC ATA CTA GTT TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG-3'	<i>SpeI</i> Klonierungsstelle mit <i>NheI</i> kompatibel
RP1 (SacII)	5'- TCC CCG CGG GCC GTC TGAATA CAT CCC GTC-3'	<i>SacII</i> Klonierungsstelle
RP2	5'-CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG TCT TCA-3'	
RP3	5'-AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC TCAAAT TTA CAA AAG GAA GCC CAT ATG-3'	
RP4(ApaI)	5'-GGG TAT TCC GGG CCC TTC AGA CGG CGC AGC AGG- 3'	<i>ApaI</i> Klonierungsstelle

Beispiel 3: Hochregulierung des *N. meningitidis* Serogruppe B *tbpA* Gens durch Austausch des Promotors

[0238] Das Ziel dieses Experiments war es, die endogenen Promotorregionen des *tbpA* Gens durch den starken *porA* Promotor zu ersetzen, um die Herstellung des TbpA Antigens hochzuregulieren. Zu diesem Zweck wurde ein Promotor Austauschplasmid mit *E. coli* Klonungsmethoden konstruiert. Eine upstream von der *tbpA* kodierenden Sequenz gelegene DNA Region (731 bp) wurde in der privaten Incyte PathoSeq Datenbank des *Neisseria meningitidis* Stamms ATCC 13090 entdeckt. Diese DNA enthält die TbpB Antigen kodierende Sequenz. Die Gene sind in einem Operon organisiert. Das *tbpB* Gen sollte deletiert werden und durch die *CmR/porA* Promotorkassette ersetzt werden. Zu diesem Zweck wurde ein DNA Fragment von 3218 bp, welches der 509 bp 5' flankierenden Region des *tbpB* Gens, der 2139 bp *tbpB* kodierenden Sequenz, der 87 bp intergenischen Sequenz und den 483 ersten Nukleotiden der *tbpA* kodierenden Sequenz entspricht, mittels PCR an genomischer DNA aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B unter Verwendung der Oligonukleotide BAD 16 (5'-GGC CTA GCT AGC CGT CTG AAG CGA TTA GAG TTT CAA AAT TTA TTC-3') und BAD17 (5'-GGC CAA GCT TCA GAC GGC GTT CGA CCG AGT TTG AGC CTT TGC-3'), die Uptake-Sequenzen und *NheI* und *HindIII* Restriktionsschnittstellen enthalten (unterstrichen), amplifiziert. Dieses PCR-Fragment wurde mit einem High Pure Kit (Boehringer Mannheim, Deutschland) gereinigt und direkt in einen pGemT Vektor (Promega, USA) kloniert. Dieses Plasmid wurde einer Circle-PCR-Mutagenese unterworfen (Jones & Winistofer (1992)), um (i) passende Restriktionsschnittstellen einzufügen, die das Klonieren einer *CmR/porA* Promotorkassette ermöglichen und (ii) 209 bp der 5' flanking Sequenz des *tbpB* und der *tbpB* kodierenden Sequenz zu deletieren. Das Circle-PCR wurde unter Verwendung der BAD 18 (5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') & der BAD 19 (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G-3') Oligonukleotide, die passende Restriktionsschnittstellen für *XmaI*, *BglII* und *XhoI* enthalten (unterstrichen), durchgeführt. Die *CmR/porA* Promotorkassette wurde vom zuvor beschriebenen pUC D15/Omp85 Plasmid amplifiziert, wobei die Primer BAD21 (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') & BAD20 (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') verwendet wurden, die die passenden Restriktionsschnittstellen *XmaI*, *SpeI*, *BglII* und *XhoI* enthalten (unterstrichen). Dieses PCR-Fragment wurde in das Circle-PCR-Plasmid kloniert. Dieses Plasmid soll dazu verwendet werden, *Neisseria meningitidis* Serogruppe B [*cps*-] und [*cps*- *porA*-] Stämme zu

transformieren. Integration durch doppeltes Crossing-over in der upstream gelegenen Region von *tbpA* wird die Insertion des *porA* Promotors direkt upstream vom *tbpA* ATG steuern.

Beispiel 4: Konstruktion eines *N. meningitidis* Serogruppe B Stamms, der für die Expression zweier Antigene TbpA und Hsf hochreguliert wird.

[0239] Das Ziel des Experiments war es, die Expression von TbpA und Hsf gleichzeitig im gleichen *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm hochzuregulieren. Die Produktion von TbpA wurde durch Ersetzen seiner endogenen Promotorregion durch den starken *porA* Promotor (Promotor Ersatz) hochreguliert. In diesem Zusammenhang wird das *tbpB* Gen, das sich upstream von *tbpA* befindet, deletiert, und das TbpB Protein ist nicht mehr in der äußeren Membran vorhanden. Die Expression von Hsf wurde durch Insertion (homologe Rekombination) einer zweiten Kopie des entsprechenden Gens am *porA* Locus (Gentransfer) hochreguliert. Beide Stämme wurden in einem getrennten Patent, das als WO 01/09350 bezeichnet wird, beschrieben. Die in beiden Strategien verwendeten Selektionsmarker (Cm^{R} oder Kan^{R}) ermöglichten die Kombination beider Integrationen in dasselbe Chromosom.

[0240] Die gesamte genomische DNA wurde aus dem rekombinanten NmB *cps*-/*TbpA*+/*PorA*+ Stamm durch das Qiagen Genomic Tip 500-G Protokoll extrahiert. Zehn μg DNA wurden o/n mit DraIII Restriktionsenzym geschnitten und dazu verwendet, *Neisseria meningitidis* Serogruppe B durch das klassische Transformationsprotokoll zu transformieren. Zellen, die für die Transformation verwendet wurden, waren entweder rekombinante NmB *cps*-/*Hsf*+/*PorA*+ (homologe Rekombination durch 1 crossing over in den *porA* Locus), oder rekombinante NmB *cps*-/*Hsf*+/*PorA*- (Allelischer Austausch/homologe Rekombination von 2 crossing over in den *porA* Locus). Sie wurden über Nacht auf GC Agar ausplattiert, das 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin enthält, verdünnt auf $\text{DO}_{650} = 0,1$ in GC flüssigem Medium 10 mM MgCl_2 , und 6 Stunden bei 37°C unter kräftigem Rühren mit 10 μg DraIII geschnittener genomischer DNA inkubiert. Rekombinante *Neisseria meningitidis*, die aus einem doppelten Crossing over-Ereignis stammen (PCR Screening), wurden auf GC Medium, das 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol enthält, selektiert und auf TbpA und Hsf Expression in OMV-Zubereitungen analysiert. Wie in [Abb. 1](#) dargestellt, wurde die Produktion von TbpA und Hsf in der OMV, die aus dem TbpA/Hsf rekombinanten NmB Stamm hergestellt wurde, im Vergleich zur OMV, die aus Kontroll NmB *cps*- Stämme hergestellt wurde, signifikant erhöht. Das Niveau der Überexpression jedes Proteins im dualen Rekombinanten ist vergleichbar mit dem Niveau der Expression, die in den entsprechenden einzelnen Rekombinanten erhalten wird. Das Niveau der Überexpression von TbpA und Hsf war in *PorA*+ und *PorA*- Stämmen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigen diese Daten, dass: (i) die Expression von TbpA und Hsf gemeinsam und gleichzeitig in *N. meningitidis* hochreguliert werden kann und (ii) rekombinante Blebs, die an TbpA und Hsf angereichert sind, erhalten und für die Immunisierung verwendet werden können.

Beispiel 5: Konstruktion eines *N. meningitidis* Serogruppe B Stamms, der für die Expression zweier Antigene hochreguliert ist: TbpA und NspA.

[0241] Das Ziel des Experiments war es, die Expression von TbpA und NspA gleichzeitig im selben *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm hochzuregulieren. Die Produktion von TbpA wurde durch Ersetzen seiner endogenen Promotorregion durch den starken *porA* Promotor (Promotor Ersatz) hochreguliert. Die Expression von NspA wurde durch Insertion (homologe Rekombination) einer zweiten Kopie des entsprechenden Gens am *porA* Locus (Gentransfer) hochreguliert. Beide Stämme wurden einzeln in einem separaten Patent WO 01/09350 beschrieben. Die Selektionsmarker, die in beiden Strategien (Cm^{R} oder Kan^{R}) verwendet werden, erlauben die Kombination der beiden Integrationen in dasselbe Chromosom.

[0242] Gesamte genomische DNA wurde aus dem rekombinanten NmB *cps*-/*TbpA*+/*PorA*+ Stamm durch das Qiagen Genomic Tip 500-G Protokoll extrahiert. Zehn μg DNA wurden o/n mit AatII Restriktionsenzym geschnitten und dazu verwendet, *Neisseria meningitidis* Serogruppe B durch das klassische Transformationsprotokoll zu transformieren. Zellen, die für die Transformation verwendet wurden, waren rekombinante NmB *cps*-/*NspA*+/*PorA*-. Sie wurden über Nacht auf GC Agar ausplattiert, das 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin enthält, verdünnt auf $\text{DO}_{650} = 0,1$ in GC flüssigem Medium 10 mM MgCl_2 , und 6 Stunden bei 37°C unter kräftigem Rühren mit 10 μg AatII geschnittener genomischer DNA inkubiert. Rekombinante *Neisseria meningitidis*, die von einem doppelten crossing over-Ereignis stammen (PCR Screening), wurden auf GC Medium selektiert, das 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol enthält, und auf TbpA and NspA Expression in OMV-Zubereitungen analysiert. Die Produktion von sowohl TbpA als auch NspA war im OMV, das mit dem TbpA/NspA rekombinanten NmB Stamm hergestellt wurde, wurde im Vergleich zu OMV, die aus Kontroll-NmB *cps*- Stämmen hergestellt wurde, signifikant erhöht. Das Niveau der Überexpression jedes Proteins im dualen Rekombinanten ist vergleichbar mit dem Niveau der Expression, die in den entsprechenden einzelnen Rekombinanten erhalten

wird. Insgesamt zeigen diese Daten, dass: (i) die Expression von TbpA und NspA gemeinsam und gleichzeitig in *N. meningitidis* hochreguliert werden kann und (ii) rekombinante Blebs, die an TbpA und NspA angereichert sind, erhalten und für die Immunisierung verwendet werden können.

Beispiel 6: Konstruktion eines *N. meningitidis* Serogruppe B Stamms, der für die Expression zweier Antigene hochreguliert ist: NspA und D15/Omp85

[0243] Das Ziel des Experiments war es, die Expression von NspA und D15/Omp85 gleichzeitig im selben *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm hochzuregulieren. Die Produktion von D15/Omp85 wurde durch Ersetzen seiner endogenen Promotorregion durch den starken *porA* Promotor (Promotor Ersatz) hochreguliert. Die Expression von NspA wurde durch Insertion (homologe Rekombination) einer zweiten Kopie des entsprechenden Gens am *porA* Locus (Gentransfer) hochreguliert. Beide Stämme wurden in einem separaten Patent WO 01/09350 beschrieben. Die Selektionsmarker, die in beiden Strategien (Cm^R oder Kan^R) verwendet wird, erlaubt die Kombination der beider Integrationen in dasselbe Chromosom.

[0244] Gesamte genomische DNA wurde aus den rekombinanten NmB *cps*-/D15- Omp85/*PorA*+ Stämmen durch das Qiagen Genomic Tip 500-G Protokoll extrahiert. Zehn μg DNA wurden o/n mit AatII Restriktionsenzym geschnitten und dazu verwendet, *Neisseria meningitidis* Serogruppe B durch das klassische Transformationsprotokoll zu transformieren. Zellen, die für die Transformation verwendet wurden, waren rekombinante NmB *cps*-/NspA+/*PorA*-. Sie wurden o/n auf GC Agar ausplattiert, das 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin enthält, verdünnt auf $\text{DO}_{650} = 0,1$ in GC flüssigem Medium 10 mM MgCl_2 , und 6 Stunden bei 37°C unter kräftigem Rühren mit 10 μg AatII geschnittener genomischer DNA inkubiert. Rekombinantes *Neisseria meningitidis*, das von einem doppelten crossing over-Ereignis stammt (PCR Screening), wurden auf GC Medium selektiert, das 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol enthält, und auf NspA und D15/Omp85 Expression in OMV Zubereitungen analysiert. Die Produktion von sowohl NspA als auch D15/Omp85 war im OMV, das mit NspA/D15-Omp85 rekombinanten NmB Stamm hergestellt wurde, wurde im Vergleich zu OMV, die aus Kontroll NmB *cps*- Stämmen hergestellt wurde, signifikant erhöht. Das Niveau der Überexpression jedes Proteins im dualen Rekombinanten ist vergleichbar mit dem Niveau der Expression, die in den entsprechenden einzelnen Rekombinanten erhalten wird. Insgesamt zeigen diese Daten, dass: (i) die Expression von NspA und Omp85 gemeinsam und gleichzeitig in *N. meningitidis* hochreguliert werden kann und (ii) rekombinante Blebs, die an NspA und Omp85 angereichert sind, erhalten und für die Immunisierung verwendet werden können.

Beispiel 7: Herstellung und Aufreinigung von rekombinanten Hsf Formen in *E. coli*

[0245] Eine Computeranalyse des Hsf ähnlichen Proteins aus *Neisseria meningitidis* zeigt mindestens vier strukturelle Domänen. Wird die Hsf Sequenz von Stamm H44/76 als Referenz herangezogen, kodiert Domäne 1, umfassend Aminosäure 1 bis 51, ein *sec*-abhängiges Signalpeptid, das für die Autotransporterfamilie charakteristisch ist, Domäne 2, die die Aminosäuren 52 bis 473 umfasst, kodiert die Passenger-Domäne, die wahrscheinlich oberflächenexponiert und zugänglich für das Immunsystem ist, Domäne 3, die die Aminosäuren 474 bis 534 umfasst, kodiert eine putative Coiled Coil-Domäne, die für die Proteinoligomerisierung erforderlich ist, und ein Hinge (Hals), Domäne 4, die die Reste 535 bis zum C-Terminus umfasst, wobei man annimmt, dass die Domäne 4 Beta-Stränge kodiert, die wahrscheinlich in einer Faß-ähnlichen Struktur zusammenkommen und in der äußeren Membran verankert werden (Henderson et al., (1998), Trends Microbiol. 6: 370–378; Hoiczky et al., (2000), EMBO 22: 5989–5999). Da die Domänen 2 und 3 wahrscheinlich oberflächenexponiert sind, sind sie gut konserviert (in mehr als 80% in allen getesteten Stämmen, wie in Pizza et al., (2000), Science 287: 1816–1820 beschrieben) und stellen interessante Impfstoffkandidaten dar. Zu diesem Zweck wurden Domäne 2 (bezeichnet als Hsf Passenger Domäne) und Domänen 2 + 3 (bezeichnet als Hsf Neck + Coiled-Coil Domäne) in *E. coli* exprimiert und aus *E. coli* gereinigt. DNA Fragmente, die Aminosäuren 52–473 (Hsf Passenger) und 52–534 (Hsf n + cc) kodieren, wurden PCR amplifiziert unter Verwendung von Oligonukleotiden, wobei endständige RcaI (Forward Primer) und XhoI (Reverse Primer) Restriktionsschnittstellen hinzugefügt wurden. Gereinigte Amplikons wurden mit RcaI/XhoI unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verdaut, und wurden anschließend in die NcoI (kompatibel mit RcaI)/XhoI Stellen des pEP24d (Novagen Inc., Madison WI) *E. coli* Expressionsvektors geklont. Rekombinante Plasmide wurden ausgewählt und verwendet, um gereinigte rekombinante Plasmide herzustellen. Für die Expressionsstudie wurden diese Vektoren (pET Hsf pas & pET-Hsf ncc) in den *Escherichia coli* Stamm B121DE3 (Novagen) eingeführt, in dem das Gen für die T7 Polymerase unter der Kontrolle des Isopropyl-beta-D Thiogalaktosid (IPTG)-regulierbaren lac Promotors steht. Flüssige Kulturen (700 ml) des NovaBlue (DE3) [pET-24b/BASB029] *E. coli* rekombinanten Stamms wurden bei 37°C unter Rühren gezüchtet, bis die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) 0,6 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Kultur wurde für weitere 4 Stunden gezüchtet. Die Kultur wurde dann mit 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das Pellet wurde bei –

20°C für mindestens 10 Stunden gefroren. Nach dem Auftauen wurde das Pellet (680 ml Kultur) während 30 Minuten bei 22°C in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0 vor der Zellyse durch zwei Durchläufe durch einen Rannie Disruptor resuspendiert. Lysierte Zellen wurden 30 Min mit 15.000 Umdrehungen pro Minute (Beckman J2-HS Zentrifuge, JA-20 Rotor) bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde auf eine Q-Sepharose Fast Flow Säule (Pharmacia) geladen, die in 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 äquilibriert wurde. Nach Passage des Durchflusses wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 gewaschen. Das rekombinante Protein wurde von der Säule mit 250 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8 eluiert. Antigenpositive Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0 dialysiert. 0,5 M NaCl und 20 mM Imidazol wurden der dialysierten Probe zugegeben. Die Probe wurde dann auf eine Ni-NTA Agarose Säule (Qiagen) gegeben, die in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert wurde, der 500 mM NaCl und 20 mM Imidazol enthält. Nach Passage des Durchflusses wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen, der 500 mM NaCl und 20 mM Imidazol enthält. Verunreinigungen wurden durch 100 mM Imidazol in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0 eluiert. Das rekombinante Protein wurde von der Säule mit 250 mM Imidazol in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0 eluiert. Antigenpositive Fraktionen wurden vereinigt und gegen 10 mM Phosphatpuffer pH 6,8, der 150 mM NaCl enthält, dialysiert. Wie in [Abb. 2](#) gezeigt, wurde ein angereichertes Hsf ähnliches Passenger-Protein (geschätzte Reinheit mehr als 90% in CBB gefärbtem SDS-PAGE), das um etwa 47 kDa wandert (geschätztes relatives Molekulargewicht), wurde von der Säule eluiert. Dieses Polypeptid war gegen einen monoklonalen Mausantikörper, der gegen das 5-Histidin Motiv produziert wurde, reaktiv. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass beide Hsf Passenger- und Hsf ncc Gene unter einer rekombinanten Form in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden können.

Beispiel 8: Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem Hap Passenger in *E. coli*

[0246] Computeranalyse des Ha-ähnlichen Proteins aus *Neisseria meningitidis* zeigt mindestens drei strukturelle Domänen. Wird die Hap-ähnliche Sequenz von Stamm H44/76 als Referenz herangezogen, kodiert Domäne 1, umfassend Aminosäuren 1 bis 42, ein sec-abhängiges Signalpeptid, das für die Autotransporterfamilie charakteristisch ist, Domäne 2, die Aminosäuren 43 bis 950 umfasst, kodiert die Passenger-Domäne, die wahrscheinlich oberflächenexponiert und zugänglich für das Immunsystem ist; man nimmt an, dass Domäne 3, die Aminosäuren 951 bis zum C-Terminus (1457) umfasst, Beta-Stränge kodiert, die wahrscheinlich in einer Faß-ähnlichen Struktur zusammenkommen und in der äußeren Membran verankert werden. Da die Domäne 2 wahrscheinlich oberflächenexponiert und gut konserviert ist (mehr als 80% in allen getesteten Stämmen), und als Untereinheiten-Antigen in *E. coli* hergestellt werden konnte, stellt sie einen interessanten Impfstoffkandidaten dar. Da die Domänen 2 und 3 wahrscheinlich oberflächenexponiert und gut konserviert sind (mehr als 80% in allen getesteten Stämmen; wie in Pizza et al. (2000), *Science* 287: 1816–1820 beschrieben), stellen sie interessante Impfstoffkandidaten dar. Zu diesem Zweck wurde Domäne 2 (bezeichnet als Hap Passenger Domäne) in *E. coli* exprimiert und aus *E. coli* gereinigt. Ein DNA Fragment, das die Aminosäuren 43–950 (Hap Passenger) kodiert, wurde PCR amplifiziert unter Verwendung von Oligonukleotiden, wobei endständige NcoI (Forward Primer) und XhoI (Reverse Primer) Restriktionsschnittstellen hinzugefügt wurden. Gereinigte Amplikons wurden mit NcoI/XhoI unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verdaut, und wurden anschließend in die NcoI/XhoI Stellen des pET24d (Novagen Inc., Madison WI) *E. coli* Expressionsvektors kloniert. Rekombinante Plasmide wurden ausgewählt und in großem Maßstab aufgereinigt. Für die Expressionsstudie wurden diese Vektoren (pET-Hap pass) in den *Escherichia coli* Stamm B121DE3 (Novagen) eingeführt, in dem das Gen für die T7 Polymerase unter der Kontrolle des Isopropyl-beta-D-thiogalaktosid (IPTG)-regulierbaren lac Promotors steht.

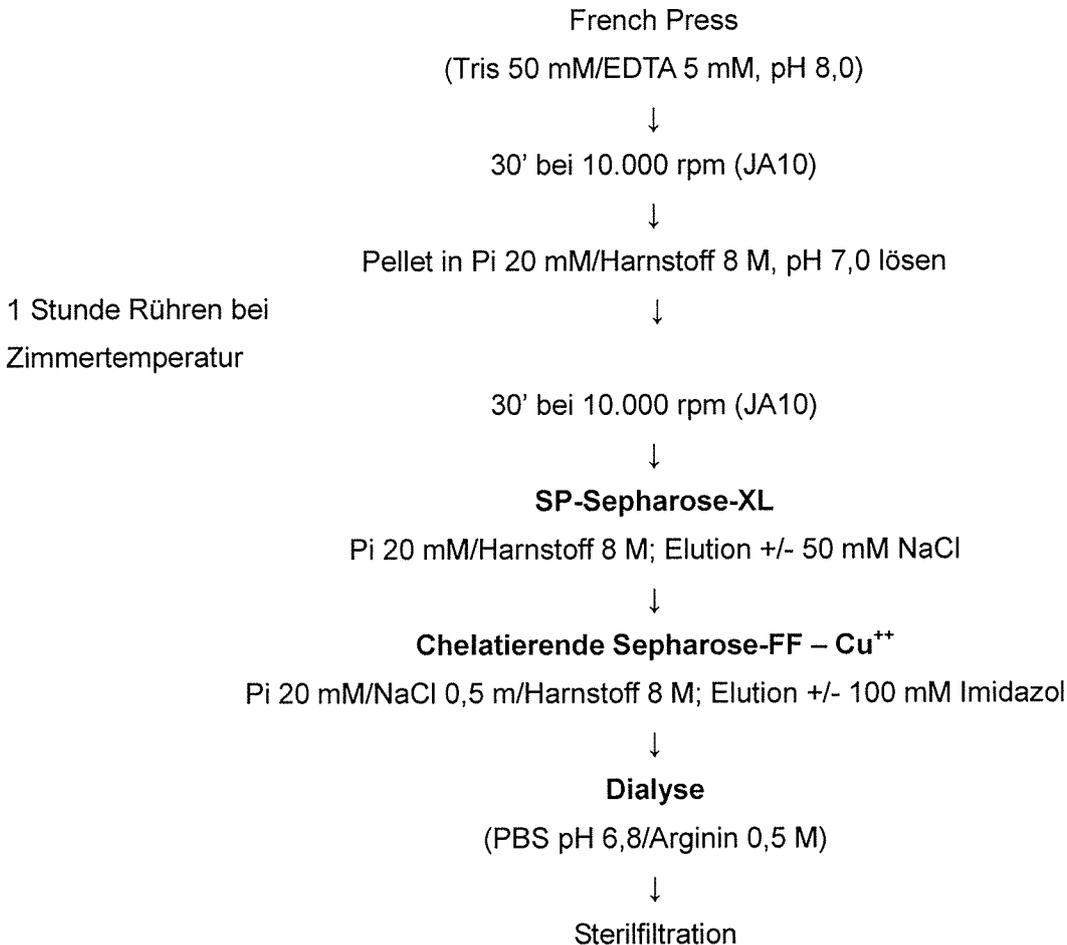
[0247] Kultivierung von *E. coli* BL21[pET-Hap pass] im Fermenter: Ein Aliquot (100 µl) des Master-Seed wurde auf FEC013AA Platten gestrichen (Soja Pepton A3 20 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, NaCl 5 g/L, Agar 18 g/L, destilliertes H₂O bis zu 1 L) und 20 Stunden bei 37°C kultiviert. Der Bakterienrasen wurde geerntet und in sterilem Wasser, das NaCl 0,9% enthält, resuspendiert.

[0248] Diese Lösung wurde verwendet, um einen 20 L Fermenter, der im Batch-Modus mit FEC011AC Medium verwendet wird (Soja Pepton 24 g/L, Hefeextrakt 48 g/L, MgSO₄/7H₂O 0,5 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, NaH₂PO₄/2H₂O 0,45 g/L, Glycerin (87%) 40 g und destilliertes H₂O bis zu 1 L zu beimpfen). Temperatur (30°C), pH (6,8, NaOH 25%/H₃PO₄ 25%) und Druck (500 mbar) wurden konstant gehalten und die Belüftung auf 20 L/min eingestellt. Unter diesen Bedingungen wurde der Druck gelösten Sauerstoffs durch Anpassen des Rührens (100 bis 1000 rpm) bei 20% gehalten. Inducer (IPTG, 1 mM) wurde nach 8 Stunden Wachstum zugefügt (OD = 27, 8). Proben (6 L) wurden nach 6 Stunden (OD = 49,2) und 16H30 gesammelt (OD = 48,6), Biomasse wurde durch Zentrifugieren geerntet und die entsprechenden Pellets bei –20°C gelagert.

Reinigung von Hap-Passenger:

[0249] Hap-Passenger wurde von einem Fermenter in Batch Modus gereinigt.

[0250] Ein Reinigungsschema wurde entwickelt (siehe unten).



[0251] Die Mehrheit des Hap-Passengers wird nach dem Zellaufschluß im Zentrifugationspellet zurückgewonnen. Die Solubilisierung wurde durch 8 M Harnstoff ermöglicht. Trotz N-term His-tail war IMAC nicht als 1. Schritt operativ, aber gut nach einem ersten Schritt auf SP-XL Kationenaustauscher. Auf dieser SP-Sepharose-XL wird das Protein quantitativ in der Mitte eines linearen NaCl (0–250 mM) Gradienten eluiert. IMAC wurde mit Cu⁺⁺-beladener chelatierender Sepharose FF durchgeführt, wie für FHAb. Dieses Mal, im Gegensatz zu FHAb, zeigt IMAC einen bedeutenden Reinigungsfaktor. Auf SDS-PAGE scheint HAP2/3 nach IMAC rein zu sein. Der HAP2/3 Peak war jedoch sehr breit mit einem 0–200 mM Imidazolgradienten, daher versuchten wir die Elution durch Imidazolstufen (10 mM–100 mM); der Gradienten-Modus scheint jedoch in Bezug auf Reinheit effizienter zu sein. Als letzten Schritt haben wir versucht, den Harnstoff-zu-Arginin Pufferaustausch durch Gelpermeation durchzuführen, jedoch ist in diesem Fall das Protein auf zwei Peaks eluiert. Diese beiden Peaks zeigen ein vergleichbares Profil auf SDS-PAGE, daher kann man hypothetisieren, dass dies eine Folge einer teilweisen Rückfaltung des Hap-Passengers ist. Wir gingen dann als letzten Schritt für einen Pufferaustausch zur klassischen Dialyse zurück. SDS-PAGE Analyse zeigt eine gute Reinheit des zuletzt erhaltenen Materials (siehe [Abb. 3](#)). Die Hap-Passenger Reinheit wird weiter durch WB anti-his bestätigt. Es wird von anti-E. coli erkannt. Ein Molekulargewicht von 96,1 KD wird gefunden.

Beispiel 9: Herstellung und Reinigung von rekombinanten FrpA/C Formen in E. coli

[0252] *Neisseria meningitidis* kodiert zwei RTX Proteine, FrpA & FrpC genannt, die bei Eisenmangel ausgeschieden werden (Thompson et al., (1993) J. Bacteriol. 175: 811–818; Thompson et al., (1993) Infect. Immun. 61: 2906–2911). Der RTX (Repeat ToXin) Proteinfamilie ist eine Serie von 9 Aminosäurewiederholungen in der Nähe ihrer C-Termini gemeinsam, mit dem Konsens: Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly (Asn/Asp) Asp Xaa. (LXGGXGN_DDX). Man nimmt an, dass die Wiederholungen in E. coli HlyA die Stelle der Ca²⁺-Bindung ist. Wie in [Abb. 4](#) gezeigt, teilen Meningokokken-FrpA und FrpC Proteine, wie im Stamm FAM20 charakterisiert,

umfangreiche Aminosäurenähnlichkeit in ihren mittleren und C-terminalen Regionen, jedoch sehr begrenzte Ähnlichkeit (wenn überhaupt) am N-Terminus. Darüber hinaus weist die Region, die zwischen FrpA und FrpC konserviert ist, einigen Polymorphismus durch Wiederholung eines 9 Aminosäure-Motivs auf (13-mal in FrpA und 43-mal in FrpC). Zur Bewertung des Impfstoff Potenzials von FrpA & FrpC produzierten wir rekombinant in *E. coli* Protein Regionen, die zwischen FrpA und FrpC konserviert sind. Zu diesem Zweck wurde ein DNA-Segment, das die Aminosäuren 277 bis 1007 (bezogen auf die *N. meningitidis* FAM20 Peptidsequenz) abdeckt, aus *N. meningitidis* Serogruppe B H44/76 Genom mittels Forward-Primer FrpA-19 (5'-CTCGAGACCATGGGCAAATATCATGTCTACGACCCCTCGC-3') und Reverse-Primer FrpA-18 (3'-GTG CATAGTGTCTAGAGTTTTTGTCTGACGTCGTAATTATAGACC-3') PCR amplifiziert. Drei Amplikons von jeweils ~1530 bp (3 Wiederholungen), ~2130 bp (13 Wiederholungen) und 2732 bp (23 Wiederholungen) wurden erhalten und mit NcoI und Sall Restriktionsendonukleasen verdaut. Diese Fragmente wurden dann in die NcoI/XhoI (kompatibel mit Sall) Stellen von pET24d inseriert und rekombinante Plasmide (jeweils pET-Frp3, pET-Frp13 und pET-Frp23) wurden ausgewählt und dazu verwendet, um *E. coli* BL21DE3 Zellen zu transformieren. Wie in [Abb. 5](#) dargestellt, produzieren alle drei Konstrukte rekombinante FrpA/C konservierte Domänen nach Induktion. Darüber hinaus erhöht sich die Löslichkeit des rekombinanten Proteins wenn sich die Anzahl der Wiederholungen erhöht, wie durch Zellfraktionierungsanalyse (Daten nicht gezeigt) bestimmt wurde.

[0253] Reinigung der konservierten FrpA/C Domäne, die 23 Wiederholungen des Nonapeptids LXGGXGN/DDX enthält (911 aa insgesamt): 3,5 Liter *E. coli* B121DE3[pET-Frp23] wurden kultiviert und nach Erreichen einer OD von 0,6 4 Stunden durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und das entsprechende Pellet wurde mittels Druck aufgebrochen, durch Zentrifugieren geklärt und der entsprechende Überstand auf eine Ni²⁺-Ionen Metallaffinitätssäule (Ni-NTA-Agarose, Qiagen GmbH) geladen. Imidazol () wurde für die Elution verwendet und wurde schließlich durch extensive Dialyse gegen 10 mM N-Phosphat pH 6,8, 150 mM NaCl, entfernt.

Beispiel 10: Produktion und Aufreinigung von rekombinanten FHA Formen in *E. coli*

Klonieren eines verkürzten FhaB aus *N. meningitidis*

[0254] Aus 10¹⁰ Zellen des *N. meningitidis* Serogruppe B Stamms H44/76 wurde genomische DNA mit dem QIAGEN genomische DNA ExtraktionsKit (Qiagen GmbH) extrahiert. Dieses Material (1 µg) wurde dann einer Polymerase-Kettenreaktions-DNA-Amplifizierung unterworfen, wobei die folgenden spezifischen Primer des FhaB Gens verwendet wurden: JKP: 5'AAT GGA ATA CAT ATG AAT AAA GGT TTA CAT CGC ATT ATC3' und 57JKP 5'CCA ACT AGT GTT TTT CGC TAC TTG GAG CTG T3'. Ein DNA-Fragment von etwa 4200 bp, das die ersten 1433 N-terminalen Aminosäuren des Proteins kodiert, wurde erhalten, mit NdeI/Spel Restriktionsendonukleasen verdaut und in die entsprechenden Stellen des pMG MCS (pMG-Derivat, Proc Natl Acad Sci U S A 1985 Jan, 82 (1): 88–92) unter Verwendung von Standard Techniken der Molekularbiologie (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor Press 1989), inseriert. Die DNA-Sequenz des klonierten FhaB Fragments wurde unter Verwendung des Big Dye Cycle Sequencing Kits (Perkin-Elmer) und einem ABI 373A/PRISM DNA Sequenzer (siehe [Abb. 1](#)) bestimmt. Das rekombinante pMG-FhaB Plasmid (1 µg) wurde dann einer Polymerase-Kettenreaktions-DNA-Amplifizierung unterworfen, wobei für FhaB spezifische Primer (XJKP03 5'AATGGAATACATATGAATAAAGGTTTACATCGCATTATCTTTAG3' und XJKP5702 5'GGGGCCACTCGAGGTTTTTCGCTACTTGGAGCTGTTTCAGATAGG3') verwendet wurden. Ein 4214 bp DNA-Fragment wurde erhalten, mit NdeI/XhoI Restriktionsendonukleasen verdaut und in die entsprechenden Stellen des pET-24b Klonierungs/Expressionsvektors (Novagen) mit Standard-Techniken der Molekularbiologie (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989) inseriert. Zur Bestätigung wurde eine Sequenzierung des rekombinanten pET-24b, das verkürztes FhaB enthält (pEP24b/FhaB2/3) mit dem Big Dyes Kit (Applied Biosystems) durchgeführt und auf einem ABI 373/A DNA-Sequenzer unter den vom Hersteller beschriebenen Bedingungen analysiert. Die daraus resultierende Nucleotidsequenz ist in [Abb. 6](#) dargestellt.

Expression und Aufreinigung von rekombinant verkürztem FhaB Protein in *Escherichia coli*.

[0255] Die Konstruktion der pET24b/FhaB2/3 Klonierungs/Expressionsvektoren wurde oben beschrieben. Dieser Vektor birgt das verkürzte FhaB Gen, das aus dem Stamm H44/76 isoliert wurde, in Fusion mit einer Strecke von 6 Histidinresten (am C-Terminus des rekombinanten Produkts), die unter der Kontrolle des starken Bakteriophagen T7 Gen 10 Promotors platziert wurde. Für die Expressionsstudie wurde dieser Vektor in den *Escherichia coli* Stamm NovaBlue (DE3) (Novagen) eingeführt, in dem das Gen für die T7-Polymerase unter die Kontrolle des Isopropyl-beta-D thiogalaktosid (IPTG)-regulierbaren lac-Promotors gestellt wird. Flüssige Kulturen (100 ml) des rekombinanten NovaBlue (DE3) [pET24b/FhaB2/3] *E. coli* Stamms wurden bei 37°C

unter Rühren bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm (OD600) gezüchtet. Zu diesem Zeitpunkt wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Kultur wurde für weitere 4 Stunden gezüchtet. Die Kultur wurde dann bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Pellet wurde bei -20°C für mindestens 10 Stunden eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Pellet 30 Minlang bei 25°C in Puffer A (6 M Guanidin hydrochlorid, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris, pH 8,0) resuspendiert, dreimal durch eine Nadel gelassen und durch Zentrifugation geklärt (20000 rpm, 15 Min). Die Probe wurde dann bei einer Flussrate von 1 ml/Min auf eine mit Ni^{2+} -beladenen Hitrap Säule (Pharmacia Biotech) geladen. Nach Durchgang des Durchflusses, wurde die Säule sukzessive mit 40 ml Puffer B (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris, pH 8,0), 40 ml Puffer C (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris, pH 6,3) gewaschen. Das rekombinante Protein FhaB2/3/His6 wurde dann von der Säule mit 30 ml Puffer D (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris, pH 6,3), der 500 mM Imidazol enthält, eluiert und Fraktionen von 3 ml wurden gesammelt. Wie in [Abb. 7](#) gezeigt, wurde ein hochangereichertes FhaB-2/3/His6 Protein aus der Säule eluiert, das um etwa 154 kDa wandert (geschätzte relative Molekülmasse). Das Polypeptid war mit einem monoklonalen Mausantikörper, der gegen das 5-Histidin Motiv produziert wird, reaktiv. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass FhaB2/3 in rekombinanter Form in E. coli exprimiert und gereinigt werden kann.

Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem FhaB2/3/His

[0256] Teilweise gereinigtes rekombinantes Protein FhaB2/3/His6, das in E. coli exprimiert wurde, wurde dreimal in Balb/C Mäusen an den Tagen 0, 14 und 29 (10 Tiere/Gruppe) injiziert. Die Tiere wurden subkutan mit ungefähr 5 μg Antigen in zwei verschiedenen Formulierungen injiziert: entweder adsorbiert auf 100 μg AlPO_4 oder in SBAS2 Emulsion formuliert (SB62 Emulsion mit 5 μg MPL und 5 μg QS21 pro Dosis). Eine negative Kontrollgruppe, bestehend aus Mäusen, die nur mit der SBAS2 Emulsion immunisiert wurden, ist auch in das Experiment aufgenommen worden. Den Mäusen wurden am Tag 29 (15 Tage nach II (engl.: post II)) und 35 (6 Tage nach III (engl.: post III)) Blut abgenommen, um spezifische anti-FhaB Antikörper nachzuweisen. Spezifische Anti-FhaB Antikörper wurden auf vereinigten Seren (von 10 Mäusen/Gruppe) durch ELISA mit gereinigtem rekombinante FhaB2/3/His gemessen.

Beispiel 11: Adhäsion blockierende Aktivitäten von Maus- und Kaninchen-Seren, die gegen FHA-, Hap- und Hsf-Antigene produziert werden

[0257] Zu den Meningokokken FHAB-ähnlichen, Hsf-ähnlichen und Hap-ähnlichen homologe Proteine wurden bereits als wichtigen Virulenz determinanten der und als Vermittler bakterieller Adhäsion von Bordetella pertussis (FHA) und Haemophilus influenzae (Hap und HSF) beschrieben. Es ist bekannt, dass die Adhäsion an Epithel- und Endothelzellen entscheidend für die Besiedlung des Nasopharynx und das Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke durch die Meningokokken ist. Daher stellt die Störung der Adhäsion von N. meningitidis einen wertvoller Ansatz dar, um Meningokokken-Kolonisation und -Infektion zu kontrollieren. Hier haben wir überprüft, ob Anti-Seren, die gegen die Meningokokken-FHAB 2/3rd, Hap-ähnlichen und HSF-ähnlichen Antigene gerichtet sind, in der Lage waren, die Adhäsion von Neisseria meningitidis an Endothelzellen zu beeinträchtigen. Das folgende experimentelle Verfahren wurde verwendet:

Hemmung der Adhäsion an HUVECs: Der Meningokokken-Teststamm, der in dieser Studie verwendet wurde, war ein nicht-verkapseltes, nicht piliniertes Opa- und OpC-Derivat des Stammes NmA8013. Meningokokken-Zellen ($2 \cdot 10^5$ Kolonie bildende Einheiten (KBE) des NmA8013 Derivats) wurden 30 Minuten lang bei 37°C in einem Medium aus 400 μl RPMI, 50 μl fetalem Rinderserum und 50 μl des auf adhäsionsblockierende Eigenschaften zu testenden Serums inkubiert. Diese Mischung wurde dann in eine Vertiefung, die konfluente Monolayer menschlicher Nabelschnur-Endothelzellen enthält (HUVECs), gegeben, deren Kulturmedium zuvor entfernt wurde. Bakterien und HUVECs Zellen wurden 4 Stunden lang bei 37°C unter 5% CO_2 inkubiert. Zellmonoschichten wurden dann dreimal mit frischem RPMI Serum gewaschen und anschließend von der Platte gekratzt. KBE, die mit HUVECs Zellen assoziiert waren, wurden dann durch Verdünnungsreihen und Ausplattieren des Zelllysats auf GC-Platten bestimmt. Die Platten wurden 48 Stunden lang bei 37°C inkubiert, um die Erholung und das Wachstum der Zell-assoziierten Meningokokken zu ermöglichen.

[0258] Adhäsionsblockierende Aktivitäten der Maus- und Kaninchen-Seren, die gegen rekombinantes FHAB2/3rd, Hap & hsf Antigene produziert werden: Anti-FHA 2/3, Vollängen-anti-Hsf (beschrieben in WO 99/58683) und Vollängen-Anti-Hap (WO 99/55873) Antikörper, sowie anti-Seren, die gegen entsprechende Hsf & Hap Passenger-Domänen gerichtet sind, stören die Meningokokken-Adhäsion an endothelial HUVEC-Zellen. **Abb. 8** zeigt, dass spezifische Antikörper, die durch in AlPO_4 formuliertes FHA 2/3 induziert wurden, die Neisseria meningitidis B Adhäsion an HUVEC-Zellen im Vergleich zu den Adjuvantien allein inhibieren konnten. Im Vergleich zum SBAS2 Adjuvant allein (ohne Antigen, Gruppe 4), ist Anti-FHA 2/3 abs (SBAS2 Formulierung) immer noch wirksam, aber weniger wirksam als AlPO_4 . Das SBAS2 Adjuvant allein (ohne Antigen) induziert

Antikörper, die in der Lage sind, die Adhäsion zu beeinträchtigen, nicht. Im Vergleich zu der Gruppe 4, könnten anti-Hap Antikörper (Gruppe 1) eine leichte Hemmwirkung haben. Wenn eine Mischung aus anti-FHA 2/3, anti-Hsf und anti-Hap Antikörper getestet wird, ist in der Gruppe 5 eine Hemmung der Adhäsion stärker als mit Anti-FHA 2/3 allein, was auf eine synergistische Wirkung von anti-Hap und Anti-Hsf Antikörpern hinweist. In einem zweiten Hemmungsexperiment ([Abb. 2](#)) konnte ein spezifisches Kaninchen-Antiserum, das gegen anti OMVs gerichtet ist, die Hsf (als Proteinkandidat) überexprimieren, teilweise die Fixierung von *Neisseria meningitidis* B auf den Endothelzellen im Vergleich zu der Negativkontrolle inhibieren (Gruppe 3 vs 4). Man konnte zeigen, dass dieses Kaninchen-Antiserum einen sehr hohen spezifischen anti-Hsf Antikörpertiter enthält. Antikörper gegen rec Hsf (HSF Passenger- und Vollängen Hsf) sind auch in der Lage, die Adhäsion von Bakterien an HUVEC-Zellen zu hemmen. Dies ist sowohl für Mäuseseren (Gruppen 5–6), als auch für Kaninchenseren (in einem geringeren Maße) (Gruppe 7–8) der Fall. In diesem zweiten Experiment bestätigen spezifische anti-rec FHA 2/3 Antikörper (Gruppe 1), die bereits im ersten Experiment getestet wurden, ihre sehr hohe hemmende Wirkung. Diese Ergebnisse zeigen, dass diese spezifischen Antigene (Hap, FHA2/3 und Hsf), isoliert oder in Kombination, interessante Impfstoffantigene sind.

Beispiel 12: Schützende Wirkung von rekombinanten OMVs im Maus Challenge-Modell

[0259] Mehrere rekombinante OMVs wurden in Balb/C Mäusen auf ihre schützende Wirkung nach tödlicher Challenge ausgewertet. Dieses aktive Immunisierungsmodell beinhaltet eine intraperitoneale Injektion von Meningokokken aus mehreren Stämmen (suspendiert in Eisen abgereichertem TSB Medium) in erwachsene Balb/C oder OF1 Mäuse (6–8 Wochen alt) nach einer Reihe von subkutanen Impfungen. Als externe Eisenquelle verwendetes Eisen-Dextran scheint notwendig zu sein, um eine Bakteriämie zu erhalten und um eine Mortalität beim infizierten Tier hervorzurufen. Obwohl gezeigt wurde, dass dieses IP-Modell in Mäusen für die Beurteilung der Virulenz-Pharynx-Infektions-Phase, des Immunschutzes und der Rolle des Eisens bei Infektionen erfolgreich ist, schliessen sie nicht die (engl.: Pharyngeal Carriage) Phase ein, die der Bakteriämie und Meningitis beim Menschen vorausgeht. Dieses Modell wurde genutzt, um unsere verschiedenen OMV Kandidaten, die NspA, TbpA oder Hsf überexprimieren, zu testen. In den folgenden Experimenten wurden Balb/C (inbred) oder OF 1 (outbred) Mäuse dreimal an den Tagen 0, 14 und 28 subkutan mit 3 (PV00N049) bis 5 µg (PV00N035 und PV00N043 Experimente) von rec. OMV, das Hsf, NspA oder TbpA überexprimiert, auf Al(OH)₃ (100 µg Al(OH)₃/Tier) (PV00N035 und PV00N043) oder auf AlPO₄ (100 µg AlPO₄/Tier) formuliert, immunisiert. Dann wurden den Tieren an den Tagen 28 (Tag 14 nach II (engl.: „past II“)) und 35 (Tag 7 nach III (engl.: „past III“)) zur Auswertung des spezifischen Antikörpers, Blut abgenommen. Am Tag 35 wurden 10 mg Eisen-Dextran eine Stunde vor der Challenge intraperitoneal injiziert. Die Challenges wurden mit H44/76 durchgeführt (B:15: P1.7,16) or CU-385 (B:4:F1.19,15) Stämmen, mit etwa 1,10 e7 KBE/Tier (siehe die Tabelle der Ergebnisse für genaue Challenge). Der heterologe Stamm, der mit dem CU-385 Stamm durchgeführt wird, ist strenger als bei der Verwendung des homologen Stammes (engl.: „The heterologous strain done with the CU-385 strain is more stringent than when using the homologous strain.“). Todesfälle wurden von den Tagen 1 bis 5 erfasst Die nachfolgende Tabelle 1 verdeutlicht, dass im Vergleich zu OMV porA(–) und in geringerem Masse mit OMV porA(+), bereits ein besserer Schutz mit OMV TbpA(+) (1/10 and 3/5 für porA(–) und 9/10 and 3/5 für porA(+)), mit OMV NspA(+) (4/10 und 4/5) und mit OMV Hsf(+) (3/10, 2/10 und 3/5) beobachtet wird. Dies ist die globale Beobachtung, die wir in diesen drei Experimenten machen können. Diese Daten unterstützen, dass die TbpA, Hsf und NspA Antigene, die an der Bleb-Oberfläche exprimiert werden, von Interesse für einen zukünftigen menB Impfstoff sind.

Tabelle 1: Schutzaktivität im Mausmodell von rekombinanten Vesikeln der äußeren Membran.

[0260] Die Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen, die in drei Experimenten erhalten wurden (PV00N35, PV00N043 & PV00N049).

OMVs (Blebs)

Rec OMVs (H44/76 Hintergrund = porA p1.17, 16)	Überlebensrate (am Tag Aktiver Schutz der Maus)			Immunospezifische Antikörper durch Elisa Durchschnitt PV 00N049 nur
	PV00N035 in OF1 Mäusen	PV00N043 in Balb/C Mäusen	PV00N049 in OF1 Mäusen	
	Challenge-Stamm (+)			
	H44/76 (B:15:P1.7, 1,27)	H44/76 (B:15:P1.7 1,0)	CU-385 (B: 4:P1.19,1 1,1)	
OMV porA(–)	1/10	0/10	1/5	/

OMV porA(+)	2/10	9/10	4/5	/
OMV TbpA porA (+)	NT	9/10	3/5	<
OMV TbpA porA(-)	NT	1/10	3/5	<
OMV NspA porA(-)	1/10	4/10	4/5	155 – (<
OMV Hsf PorA(-)	3/10	2/10	3/5	7802 – (5496)
OMV Hsf PorA(+)	NT	9/9	NT	/
Kein Antigen	0/10	0/10	1/5	/

NT: nicht getestet

Beispiel 13: Schutzwirkung rekombinanter Antigene aus Untereinheiten im Maus-Challenge-Modell

[0261] Mehrere rekombinante, gereinigte Proteine wurden in Balb/C Mäusen nach tödlicher Challenge auf ihre Schutzwirkung geprüft. Dieses aktive Immunisierungsmodell hat eine intraperitoneale Injektion von Meningokokken aus mehreren Stämmen (suspendiert in Eisen-abgereichertem TSB-Medium) in erwachsenen Balb/C oder OF1 Mäusen (6–8 Wochen alt) nach einer Reihe von subkutanen Impfungen beinhaltet.

[0262] Das Eisen-Dextran, das als externe Eisenquelle verwendet wird, scheint notwendig zu sein, um Bakteriämie zu erhalten und die Mortalität beim infizierten Tier zu induzieren. Obwohl gezeigt wurde, dass dieses IP-Modell in Mäusen für die Beurteilung der Virulenz, des Immunschutzes und der Rolle des Eisens bei Infektionen erfolgreich ist, schliessen sie nicht die Pharynx-Infektions-Phase (engl.: Pharyngeal Carriage Phase) ein, die der Bakteriämie und Meningitis beim Menschen vorausgeht.

[0263] Dieses Modell wurde genutzt, um verschiedenen menB Impfstoffkandidaten aus Untereinheiten, wie rekombinante FrpC, TbpA, FHA2/3 und Hap Moleküle zu screenen.

[0264] In diesem Experiment wurden OF1 (outbred) Mäuse dreimal an den Tagen 0, 14 und 28 subkutan mit 5 µg (PV00N050) dieser Proteine, formuliert auf AlPO₄ (100 µg) in Anwesenheit von 10 µg MPL (pro Tier) immunisiert.

[0265] Dann wird den Tieren an den Tagen 28 (Tag 14 nach II (engl. „pastII“) und 35 (Tag 7 nach III (engl.: „pastIII“)) zur Auswertung des spezifischen Antikörpers, Blut abgenommen, während sie am Tag 35 gechallenged werden. Am Tag der Challenge werden 10 mg Eisen-Dextran eine Stunde vor der Challenge intraperitoneal injiziert. Die Challenges wurden mit CU-385 Stämmen durchgeführt (B:4:P1.19,15), der in diesem Fall heterolog ist, in der Tat stammt die Sequenz des Antigens aus H44/76 (B:15:P1.7,16), mit Ausnahme von TbpA, für das die Sequenz aus dem B16B6 Stamm (B: 2a:P1.2) stammt.

[0266] Die Ergebnisse, die in Tabelle 2 dargestellt sind, zeigen, dass FrpC, TbpA, FHAB2/3rd, Hap signifikanten Schutz in diesem Modell induzierten: 2 bis 4 von 5 Mäusen haben nach der Challenge überlebt, im Vergleich zu nur 1/5 mit dem Adjuvanz allein. In allen ausser einer Gruppe waren die spezifischen Antikörper-Titer hoch (der spezifische anti-TbpA Titer war moderat). Alle diese Daten unterstützen, dass FrpC, FrpA, FrpA/C konservierte Domäne, TbpA, FHAB2/3, Hap als Antigene aus Untereinheiten, isoliert oder in Kombination präsentiert, von Interesse für die Entwicklung eines menB Impfstoffes sind.

Tabelle 2: Schutzaktivität im Mausmodell von rekombinanten Vesikeln der äußeren Membran.

[0267] Die Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen, die in einem Experiment (PV00N050) erhalten wurden.

Subunit Antigene

Rec Untereinheiten-Antigene (aus H44/76 Ag-Sequenz)	Überlebensrate (am Tag 5) Modell des aktiven Schutzes der Maus	Immunospezifische Antikörper durch Elisa Durchschnitt – (GMT)
	PV00N050 (in OF1-Mäusen	
	Challenge-Stamm/+ Dosis)	

	CU-385 (B:4:P1.19,15) 1,4 10e7	
FrpC Ca ²⁺⁺ behandelt	3/5	31477 – (27068)
FHAB 2/3 rückgefaltet	2/5	98200 – (73220)
FHAB 2/3 nicht rückgefaltet	3/5	55939 – (35347)
Hap N-ter	4/5	9960 – (12811)
recTbpA auf SBA54	3/5	875 – (520)
SBAS4	1/5	/

Beispiel 14: Verfahren, das den synergistischen Effekt der Impfstoff-Antigen Kombinationen zeigt.

[0268] Verschiedene verfügbare rekombinante OMVs (OMVs porA(+) rmp-LbpB, OMVs porA(-) TbpA(+) Hsf (+), OMVs porA(-) TbpA(+), OMVs porA(-) NspA(+), OMVs porA(-) Hsf(+), OMVs porA(-) TbpA(+) NspA(+)) können allein oder in Kombination getestet werden, um statistisch die besten Kombinationen zu bestimmen, in Bezug auf das Feststellen einer synergistischen Wirkung solcher Kombinationen von Impfstoff-Kandidaten. Diese Arbeit kann auch mit Kombinationen von Antigenen aus Untereinheiten sowie Kombination von Antigenen aus Untereinheiten + rekombinanten OMVs durchgeführt werden. 32 Gruppen von 5 OF1 Mäusen/Gruppe können injiziert und auf serumbakterizide & opsonische Aktivität, aktiven und passiven Schutz im Mausmodell (falls nötig mit suboptimalen Mengen einzelner Antigene) getestet werden. Wenn das Niveau des Schutzes, der nach der kombinierter Immunisierung verliehen wird, höher ist als die Summe der einzelnen Antigene, ist dies ein Hinweis auf synergistische Antigen-Kombinationen.

Beispiel 15: Analyse des Hsf und TbpA Gehalts der Vesikel der äußeren Membran

Coomassie blau gefärbte SDS-PAGE

[0269] 15 µg Protein in Präparaten des Vesikels der äußeren Membran mit Hochregulierung von Hsf oder TbpA oder sowohl Hsf als auch TbpA, wurden in einem Probenpuffer, der β-Mercaptoethanol enthält, verdünnt und bei 95°C für 10 Minuten erhitzt. Man ließ die Proben dann auf SDS-PAGE Polyacrylamidgel (Novex 4–20% Tris-Glycin 1,5 mm 2Dwell SDS-Page) laufen, diese wurden in Coomassie Blau für 1 Stunde gefärbt und in mehreren Waschvorgängen mit Entfärber entfärbt. Die Ergebnisse sind in [Abb. 9](#) gezeigt, die zeigen, dass das Niveau von Hsf und TbpA deutlich höher in von N. meningitidis abgeleiteten Zubereitungen des Vesikels der äußeren Membran ist, wenn ihr Expressionsniveau verstärkt wurde.

Beispiel 16: Immunogenizität von OMVs mit Hochregulierung von Hsf und/oder TbpA

[0270] Gruppen von 20 Mäusen wurden dreimal mit OMV intramuskulär an den Tagen 0, 21 und 28 immunisiert. Jede Inokulation bestand aus 5 µg (Eiweißgehalt) OMVs, auf AIPO4 mit MPL formuliert. Die OMVs wurden vom N. meningitidis Stamm H44/76 abgeleitet, der so konstruiert war, dass Kapselpolysaccharide und PorA herunterreguliert waren. Es wurden OMVs verglichen, in denen Hsf, TbpA, sowohl Hsf als auch TbpA oder keines von beiden hochreguliert waren. Am Tag 41 wurden Blutproben für die Analyse mittels ELISA oder mittels serumbakteriziden Assays genommen.

ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Hsf

[0271] Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Nunc, Maxisorb) wurden über Nacht bei 4°C mit 100 µl von 1 µg/ml des spezifischen Antigens in PBS beschichtet. Nach dem Waschen mit NaCl 150 mM Tween 20 (0,05%), wurden Platten mit 100 µl PBS-BSA (1%) unter Schütteln bei Raumtemperatur für 30 Minuten gesättigt.

[0272] Zwischen jedem Schritt (unter Schütteln bei Raumtemperatur während 30 Min lang und mit PBS-BSA 0,2% als Verdünnungsmittelpuffer durchgeführt) wurden überschüssige Reagenzien durch Waschen mit NaCl-Tween 20 entfernt. Einhundert Mikroliter der verdünnten Serumproben wurden pro Mikrovertiefung zugegeben. Gebundene Antikörper wurden von einem biotinylierten Anti-Maus-Ig (Prosan) (1/2000) erkannt. Der Antigen-Antikörperkomplex wurde durch Inkubation mit Streptavidinbiotinyliertem Peroxidase Konjugat (Amersham) (1/4000) sichtbar gemacht. OrthoPhenilenediamine/H₂O₂ (4 mg/10 ml Zitratpuffer 0,1 M pH 4,5 + 5 µl H₂O₂) wird verwendet, um den Assay zu ?? (engl: „reveal“). Die Platten wurden für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 N HCl gestoppt wurde. Die Absorption wurde bei 490 nm gemessen.

	Titermittelpunkt (von vereinigten Seren)
g1, Blebs TbpA-HSF, IM	15471
g2, Blebs TbpA, IM	15.41
g3, Blebs HSF, IM	14508
g4, Blebs CPS(-) PorA(-), IM	-
g5, MPL/AIPO4, IM	-

[0273] Die in der Tabelle oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass hohe und gleichwertige Antikörpertiter gegen Hsf durch Immunisierung mit OMVs mit Hochregulierung von Hsf oder sowohl Hsf als auch TbpA produziert wurden. Es konnte praktisch kein Antikörper gegen Hsf in Seren nachgewiesen werden, die nach der Impfung mit dem Adjuvans allein oder OMV, in denen weder Hsf noch TbpA hochreguliert worden sind, oder OMV, in denen nur TbpA hochreguliert worden ist, produziert wurden.

Beispiel 17: Serumbakterizide Aktivität von Antiseren, die gegen OMVs mit Hochregulierung von Hsf und/oder TbpA produziert wurden

[0274] Das serumbakterizide Aktivität von Antiseren aus den Mäusen, die mit OMVs mit Hochregulierung von Hsf, TbpA, sowohl Hsf als auch TbpA, oder ohne Hochregulierung geimpft wurden, wurde in Assays unter Verwendung entweder des homologen Stammes H44/76 oder des heterologen Stammes Cu385 verglichen. Man hat gezeigt, dass der serumbakterizide Assay eine gute Korrelation mit dem Schutz zeigt, und er daher ein guter Indikator dafür ist, wie effektiv eine Kandidatenzusammensetzung in der Auslösung einer schützenden Immunantwort sein wird.

[0275] *Neisseria meningitidis* Serogruppe B Wildtyp Stämme (H44/76 Stamm = B:15P1.7,16 L3,7,9 und CU 385 Stamm = B:4 P1.19,15 L3,7,9) wurden über Nacht auf MH + 1% Polyvitex + 1% Pferdeserum auf Petrischalen bei 37°C + 5% CO₂ kultiviert. Sie wurden 3 Stunden in einem flüssigen TSB Medium mit 50 µM Desferal (Eisenchelator) bei 37°C unter Schütteln subkultiviert, um eine optische Dichte von ca. 0,5 bei 470 nm zu erreichen.

[0276] Vereinigtes oder einzelnes Serum wurde 40 Min bei 56°C inaktiviert. Serum-Proben wurden 1/100 mit HBSS-BSA 0.3% verdünnt und dann seriell zweifach (8 Verdünnungen) in ein Volumen von 50 µl in Rundboden Mikrotiterplatten verdünnt.

[0277] Bakterien mit der angemessenen OD wurden in HBSS-BSA 0,3% verdünnt, um 1,3 10⁴ KBE pro ml zu ergeben. 37,5 µl dieser Verdünnung wurde zu den Serum-Verdünnungen gegeben und Mikrotiterplatten wurden für 15 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden 12,5 µl des Kaninchen Komplements in jede Vertiefung gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C und unter Schütteln wurden die Mikroplatten auf Eis gelegt, um das Töten zu beenden.

[0278] Mit der Neigungsmethode (engl. „tilt method“) wurden 20 µl jeder Vertiefung auf MH + 1% Polyvitex + 1% Pferdeserum Petrischalen ausplattiert und über Nacht bei 37°C + CO₂ inkubiert. Die KBE wurden gezählt und der prozentuale Anteil der Tötung berechnet. Der serumbakterizide Titer ist die letzte Verdünnung, die ≥ 50% Töten erreicht.

	H44/76		CU385	
	GMT	% Responder	GMT	% Responder
OMV				
CPS(-) PorA(-)	93	30%	58	5%
CPS(-) PorA(-) Hsf	158	40%	108	20%
CPS(-) PorA(-) TbpA	327	60%	147	30%
CPS(-) PorA(-) Hsf – TbpA	3355	100%	1174	80%

[0279] Ähnliche wie in der obigen Tabelle angegebenen Ergebnisse wurden in zwei weiteren ähnlichen Experimenten erhalten.

[0280] Ein dramatischer Anstieg der bakteriziden Titer (GMT) gegen den homologen Stamm und einen heterologen Stamm wurden nach der Impfung mit OMV, in dem beide Hsf und TbpA hochreguliert wurden, gesehen. Zum Vergleich wurden bakterizide GMTs an Mäusen gemessen, die mit Hsf oder TbpA hochregulierten OMVs geimpft wurden, denen ähnlich, die mit Mäusen erhalten wurden, die mit Kontroll OMVs geimpft wurden.

[0281] Der Vorteil der „Double up“-Regelung wurde auch deutlich hinsichtlich des Prozentsatzes von Mäusen beobachtet, die ein hohes Maß an bakteriziden Antikörpern (Titer größer als 1/100) produzieren, insbesondere bei Experimenten, die den heterologen Stamm benutzen.

Beispiel 18: Effekt der Vermischung von anti-Hsf und anti-TbpA Seren auf die bakterizide Aktivität

[0282] Gruppen von 20 Mäusen wurden dreimal mit OMV intramuskulär an den Tagen 0, 21 und 28 immunisiert. Jede Impfung bestand aus 5 µg (Eiweißgehalt) OMVs auf A1PO4 mit MPL formuliert. Die OMVs waren von *N. meningitidis* Stamm H44/76 abgeleitet, und so konstruiert, dass Kapselpolysaccharide und PorA herunterreguliert waren. Eine Gruppe von Mäusen wurde mit Kontroll OMVs immunisiert, in denen es keine Hochregulierung von Proteinen gab. In einer zweiten Gruppe wurde die Hsf Expression hochreguliert, in einer dritten Gruppe wurde TbpA Expression hochreguliert und in einer vierten Gruppe wurde die Expression sowohl von Hsf als auch von TbpA hochreguliert.

[0283] Die Seren wurden vereinigt, entweder unter Verwendung von Seren von Mäusen aus der gleichen Gruppe oder durch Mischen von Seren die aus der Gruppe, in der Hsf allein oder TbpA allein hochreguliert wurden, isoliert worden sind. Serumbakterizide Aktivität wurde für jedes der vereinigten Seren gemessen und die Ergebnisse sind in der Tabelle unten dargestellt.

SBA durchgeführt auf vereinigten Seren aus Mäusen, die immunisiert wurden mit	SBA Titer
TbpA-Hsf Blebs	774
TbpA Blebs	200
Hsf Blebs	50
CPS(-) PorA(-) Blebs	50
Mix anti-TbpA + anti-Hsf Seren	1162

[0284] Die Ergebnisse in der obigen Tabelle zeigen, dass das Mischen von anti-Hsf und anti-TbpA Antiseren eine sehr viel höhere serumbakterizide Aktivität ergab, als durch jedes der Antiseren alleine erreicht wurde. Der synergistische Effekt scheint durch die Anwesenheit von Antikörpern gegen sowohl Hsf als auch TbpA erreicht zu werden.

Beispiel 19: Verkürzte Hsf Proteine können synergistisch mit TbpA kombiniert werden

[0285] Eine Reihe verkürzter Hsf Konstrukte wurde mit Standardverfahren der Molekularbiologie hergestellt. Dazu gehört ein Konstrukt, das die Aminosäuren 1 bis 54 kodiert, die die Signalsequenz Hsf enthält und Aminosäuren 134 bis 592 von HSF (Tr1Hsf). Ein zweites verkürztes Hsf enthielt Aminosäuren 1–53 der Signalsequenz von Hsf, gefolgt von Aminosäuren 238–592 von Hsf (Tr2Hsf). Diese beiden verkürzten Hsf Konstrukte und Vollängen Hsf wurden in den *N. meningitidis* B Stamm MC58 siaD-, Opc, PorA- eingeführt, damit ihre Expression hochreguliert werden würde und Vesikel der äußeren Membran wurden mit dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt.

[0286] Die Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran wurden auf Al(OH)₃ adsorbiert und Mäusen an den Tagen 0, 21 und 28 injiziert. Am Tag 42 wurden den Mäusen Blut abgenommen und Seren zubereitet. Die Seren wurden mit Seren aus Mäusen, die mit hochregulierten TbpA OMVs geimpft waren gemischt, und serumbakterizide Assays wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse

Gruppe	Serumbakterizide Titer	
	H44/76	CU385
MC58 PorA+ siaD+	25600	25600
MC58 PorA- siaD- Hsf	1530	800
MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	1015	1360
MC58 PorA- siaD- Tr2 Hsf	50	50
Negativkontrolle	50	50
TbpA + MC58 PorA+ siaD+	25600	24182
TbpA + MC58 PorA- siaD- Hsf	2595	1438
TbpA + MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	4383	2891
TbpA + MC58 PorA- siaD- Tr2Hsf	1568	742
TbpA + Negativkontrolle	778	532

[0287] Die Ergebnisse, die in der obigen Tabelle dargestellt sind, zeigen, dass die erste Kürzung (Tr1Hsf) eine Immunantwort auslöst, die in der Lage ist, bei Kombination mit Antiseren gegen TbpA eine größere serumbakterizide Aktivität, als wenn man Volllängen Hsf verwendet, hervorzurufen. Allerdings ist das Ausmaß der Kürzung wichtig und die in Tr2 vorgenommene Kürzung hat einen schädlichen Effekt im Vergleich zu Volllängen Hsf. Die verbesserte bakterizide Aktivität von Tr1Hsf wurde gegen beide verwendeten Stämme beobachtet.

Beispiel 20: Serumbakterizide Aktivität von Antikörpern gegen TbpA, Hsf und ein drittes Meningokokken-Protein

[0288] N. meningitidis Stamm H66/76, in dem PorA und Kapselpolysaccharide wie oben beschrieben herunterreguliert wurden, wurde als Background-Stamm für die Hochregulierung von TbpA und Hsf, LbpB, D15, PilQ oder NspA, nach dem oben beschriebenen Verfahren verwendet. Vesikel der äußeren Membran wurden aus jedem Stamm wie oben beschrieben hergestellt. Rekombinante FHAb, FrpC, FrpA/C und Hap wurden mit Hilfe von vorstehend beschriebenen und im Stand der Technik bekannten Techniken hergestellt (wie in PCT/EP99/02766, WO 92/01460 und WO 98/02547 beschrieben).

[0289] Zubereitungen der Vesikel der äußeren Membran und rekombinante Proteine wurden auf A1(OH)₃ adsorbiert und Mäusen an den Tagen 0, 21 und 28 injiziert. Am Tag 42 wurden den Mäusen Blut abgenommen und Seren vorbereitet. Die Seren gegen TbpA- und Hsf-hochregulierte OMVs wurden mit Seren von Mäusen, die mit OMVs enthaltend hochregulierte LbpB, D15, PilQ oder NspA OMVs oder rekombinante FHAb, FrpC, FrpA/C oder Hap geimpft wurden, gemischt und serumbakterizide Assays wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse

[0290] Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt. In Assays, in denen der homologe H44/76-Stamm verwendet wird, führte die Zugabe von Antikörpern gegen ein drittes Meningokokken-Antigen, mit Ausnahme von FrpC, nicht zu einem höheren serumbakteriziden Titer als der, der unter Verwendung von Antikörpern gegen TbpA und Hsf allein erreicht wird.

[0291] Allerdings war die Zugabe von Antikörpern gegen ein drittes Antigen vorteilhaft in serumbakteriziden Assays, die einen heterologen Stamm verwendeten. Antikörper gegen D15 (OMP85), Hap, FrpA/C und LbpB waren besonders wirksam bei der Erhöhung des serumbakteriziden Titers gegen den CU385 Stamm.

Antiserenmischung	Serumbakterizider Titer	
	H44/76	CU385
Anti-TbpA-Hsf und nicht immune Seren	5378	2141
Anti-TbpA-Hsf und anti-FHA	5260	2563

Anti-TbpA-Hsf und anti-Hap	4577	5150
Anti-TbpA-Hsf und anti-FrpA/C	5034	4358
Anti-TbpA-Hsf und anti-LbpB	5400	4834
Anti-TbpA-Hsf und anti-D15	4823	4657
Anti-TbpA-Hsf und anti-PilQ	4708	2242
Anti-TbpA-Hsf und anti-NspA	4738	2518
Anti-TbpA-Hsf und anti-FrpC	6082	2300

Beispiel 21: Effekt von FrpB KO in Vesikeln der äußeren Membran auf ihre Fähigkeit, eine bakterizide Immunantwort in homologen und heterologen Stämmen hervorzurufen

[0292] Zwei Stämme von H44/76 *N. meningitidis* wurden dazu verwendet, Zubereitungen von Vesikeln der äußeren Membran, wie in WO 01/09350 beschrieben, herzustellen, wobei eine 0,1% DOC Extraktion verwendet wurde, so dass der LOS-Gehalt rund 20% betrug. Der Stamm B1733 ist *siaD(-)*, *PorA(-)*, hat eine Hochregulierung von Tr1 Hsf (Beispiel 19) und IgtB ist ausgeknockt. Der Stamm B1820 B1733 ist *siaD(-)*, *PorA(-)*, hat eine Hochregulierung von Tr1 Hsf, IgtB ist ein IgtB und FrpB knock out-Stamm. Beide Stämme wurden in Medien kultiviert, die mit 60 µM Desferal ergänzt wurden, so dass eisenregulierte Proteine, wie LbpA/B und TbpA/B hochreguliert werden.

[0293] Die Bleb-Zubereitungen wurden auf Al(OH)₃ adsorbiert und 5 µg wurden intramuskulär in Gruppen von 30 Mäusen an Tag 0 und Tag 21 injiziert. Blutproben wurden am Tag 28 entnommen.

[0294] Serumbakterizide Assays wurden mit drei L3-Stämmen (der homologe Wildtyp-Stamm H44/76 und zwei heterologe L3-Stämme; NZ124 und M97250687), wie in Beispiel 17 beschrieben, durchgeführt.

Ergebnisse

Blebs, die für die Inokulation verwendet wurden	H44/76		M97250687		NZ124	
	GMT	SC	GMT	SC	GMT	SC
B1733	1518	30/30	151	11/30	70	4/29
B1820	781	19/30	1316	24/30	276	19/30

[0295] GMT gibt die geometrischen Mittelwerte der Titer der Seren im SBA an.

[0296] SC gibt die Anzahl der serumkonvertierten Mäuse (SBA-Titer > 1/100).

[0297] Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass FrpB KO (B1820) Blebs eine bessere heterologe kreuzbakterizide Reaktion als FrpB(+) Blebs (B1733) hervorrufen. Die SBA Titer waren höher und ein höherer Anteil an Mäusen in den Stämmen M97250687 und NZ124 war serumkonvertiert. Die Ergebnisse im homologen Stamm waren nicht ganz so gut, wenn FrpB deletiert wurde. Diese Daten legen nahe, dass FrpB die Immunantwort antreibt, aber da dieses Protein der äußeren Membran sehr variabel ist, sind Antikörper gegen dieses Protein nur in der Lage, das Töten des homologen Stammes hervorzurufen.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 01/09350 [0011, 0079, 0119, 0121, 0128, 0135, 0136, 0137, 0139, 0139, 0147, 0186, 0190, 0200, 0235, 0236, 0239, 0241, 0243, 0292]
- WO 01/52885 [0012, 0176]
- WO 98/02547 [0049, 0050, 0288]
- WO 99/31132 [0049, 0051]
- WO 99/55873 [0049, 0051, 0258]
- WO 96/29412 [0049, 0097]
- WO 01/55182 [0054, 0056]
- WO 92/03467 [0059, 0097]
- US 5912336 [0059]
- WO 93/06861 [0059, 0059]
- EP 586266 [0059, 0059]
- WO 99/09176 [0059, 0107]
- WO 00/25811 [0065, 0161]
- WO 92/01460 [0067, 0288]
- EP 941738 [0075, 0079]
- WO 93/14115 [0077]
- WO 95/03327 [0077, 0139]
- EP 976402 [0077]
- WO 00/15801 [0097]
- WO 00/03003 [0097]
- WO 99/61620 [0097]
- WO 00/23593 [0097]
- WO 99/55872 [0097]
- EP 11243 [0117, 0119, 0200]
- EP 301992 [0119, 0200]
- US 5597572 [0119, 0200]
- US 4271147 [0119, 0200]
- WO 00/26384 [0139]
- WO 93/14155 [0139]
- WO 00/71725 [0171]
- US 6342224 [0182]
- WO 93/15760 [0182]
- US 4365170 [0183]
- US 4673574 [0183]
- EP 0-161-188 [0183]
- EP 208375 [0183]
- EP 0-477508 [0183]
- WO 96/05859 [0184]
- WO 90/06951 [0184]
- WO 99/03884 [0184]
- US 5804193 [0184]
- WO 97/09994 [0184]
- WO 97/41151 [0184]
- WO 99/51266 [0184]
- WO 96/40928 [0184]
- EP 0837130 [0184]
- EP 0834568 [0184]
- WO 98/18931 [0184]
- WO 98/18930 [0184]
- US 99/30390 [0184]
- WO 97/41731 [0186]
- WO 96/34960 [0186]
- EP 99/03824 [0186]
- EP 99/03823 [0186]
- EP 00/01468 [0186]
- GB 9917977 [0186]
- GB 9918208 [0186]
- GB 9918302 [0186]
- GB 9918038 [0186]
- EP 99/03038 [0186]
- EP 99/03822 [0186]
- EP 99/06781 [0186]
- EP 99/03257 [0186]
- WO 98/55606 [0186]
- WO 97/13785 [0186, 0198, 0198]
- WO 97/32980 [0186]
- WO 93/03761 [0186]
- WO 94/12641 [0190]
- EP 281673 [0190]
- WO 96/40929 [0190, 0190, 0198, 0198]
- WO 95/13370 [0190, 0190, 0198, 0198]
- WO 94/26304 [0190]
- WO 97/01638 [0190]
- US 5766608 [0195]
- US 5843464 [0195]
- WO 99/52947 [0198, 0198]
- US 6214981 [0198]
- WO 00/78968 [0198, 0198]
- WO 94/00153 [0203]
- WO 96/33739 [0203]
- WO 95/17210 [0203]
- WO 96/02555 [0204]
- WO 92/01791 [0222]
- WO 99/58683 [0258]
- EP 99/02766 [0288]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Gerbase et al. 1998 Lancet 351; (Suppl 3) 2–4 [0003]
- Peltola et al., 1985, Pediatrics 76; 91–96 [0007]
- Ala'Aldeen D und Cartwright K 1996, J. Infect. 33; 153–157 [0007]
- Rodriguez et al., 1999, Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94; 433–440 [0008]

- Sierra et al., 1990, In Neisseria, Walter Gruyter, Berlin, m. Atchman et al., (eds) p 129–134 [0008]
- Sierra et al., 1991, NIPH Ann 14, 195–210 [0008]
- Milagres et al., 1994, Infect. Immun. 62; 4419–4424 [0009]
- Tappero et al., 1999, JAMA 281; 1520 bis 1527 [0009]
- Fredriksen et al., 1991, NIPH Ann, 14; 67–80 [0010]
- Bjune et al., 1991, Lancet, 338; 1093–1096 [0010]
- Lepow et al., 1986; Peltola 1998, Pediatrics 76; 91–96 [0013]
- Perkins et al., J Infect Dis. 1998, 177: 683–691 [0027]
- J. Exp. Med (2002) 195: 1445; NMB 1994 [0049]
- Annu Rev Cell Dev Biol. 16; 423–457 (2000) [0049]
- Nature Biotech 20; 914–921 (2002) [0049]
- Mol. Microbiol. 1997, 23; 879–892 [0049]
- van Ulsen et al., Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53–64 [0051]
- Comanducci et al., J. Exp. Med. 2002 195; 1445–1454 [0051]
- Infection and Immunity 2002, 70 (8); 4447–4461; NMB 1029 [0051]
- J. Exp. Med (2002) 195: 1445 [0051]
- Pizza et al. (2000), Science 287: 1816–1820 [0057]
- Med Microbiol (1999) 32: 1117 [0059]
- Mol Microbiol. 1997, 23; 737–749 [0059]
- Mol Microbiol 1997, 23; 737–749 [0059]
- 13th International Pathogenic Neisseria Conference 2002 [0059]
- Tettelin et al., Science 287; 1809–1815 2000 [0059]
- Rokbi et al., FEMS Microbiol. Lett. 100; 51, 1993 [0061]
- Cornelissen et al., Infection and Immunity 65; 822, 1997 [0061]
- Oakhill et al., Biochem J. 2002 364; 613–6 [0065]
- 13th international Pathogenic Neisseria Conference 2002 Masignani et al., p135 [0067]
- Thompson et al., (1993) J. Bacteriol. 175: 811–818 [0069]
- Thompson et al., (1993) Infect. Immun. 61: 2906–2911 [0069]
- Griffiss et al., Inf. Immun. 1987; 55: 1792–1800 [0074]
- Scholtan et al., J Med Microbiol 1994, 41: 236–243 [0074]
- M. P. Jennings et al., Microbiology 1999, 145, 3013–3021 [0074]
- Mol Microbiol 2002, 43: 931–43 [0074]
- Wesphal und Jann Meth. Carbo. Chem. 5; 83–91 1965 [0075]
- Galanos et al., 1969, Eur J Biochem 9: 245–249 [0075]
- Wu et al., 1987, Anal Bio Chem 160: 281–289 [0075]
- Velucchi et al., (1997) J Endotoxin Res 4: 1–12 [0077]
- J. V. Staros, R. W. Wright und D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water – soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220–222 (1986) [0079]
- Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173–176 [0079]
- JV Staros, RW Wright und DM Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220–222 (1986) [0083]
- Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173–176 [0083]
- JV Staros, RW Wright und DM Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220–222 (1986) [0093]
- Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173–176 [0093]
- Infect. Immun. 1999, 67; 3533–3541 [0097]
- Mol. Biol. Evol. 12; 363–370, 1995 [0097]
- Microbiology 2001, 147; 1277–1290 [0097]
- Perkins et al., J Infect Dis. 1998. 177: 683–691 [0102]
- Maiden et al. PNAS USA 1998, 95: 3140–5 [0106]
- McChesney D et al., Infect. Immun. 36: 1006, 1982 [0110]
- Boslego J et al., Efficacy trial of a purified gonococcal pilus vaccine, in Program and Abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, American Society for Microbiology, 1984 [0110]
- Siegel M et al., J. Infect. Dis 145: 300, 1982 [0110]
- de la Pas, Microbiology, 141 (Pt4): 913–20, 1995 [0110]
- Plante M, J. Infect. Dis., 182: 848–55, 2000 [0111]
- Frederikson et al., (NIPH Annals [1991], 14: 67–80) [0119]
- Zollinger et al., (J. Clin. Invest. [1979], 63: 836–848) [0119]
- Saunders et al., (Infect. Immun. [1999], 67: 113–119) [0119]
- Drabick et al., (Vaccine [2000], 18: 160–172) [0119]
- Aho et al., 1991 Mol. Microbiol. 5: 1429–1437 [0136]
- Poolman et al., (1985 J. Med. Micro. 19: 203–209) [0136]

- Microbiology 142; 3269–3274 (1996) [0137]
- J. Bacteriol. 181; 2895–2901 (1999) [0137]
- Frosh et al., 1990, Mol. Microbiol. 4: 1215–1218 [0143]
- G. Bjune et al, Lancet (1991), 338, 1093–1096 [0144]
- GVG. Sierra et al., NIPH ann (1991), 14, 195–210 [0144]
- M. P. Jennings et al., Microbiology 1999, 145, 3013–3021 [0149]
- J. Exp. Med. 180: 2181–2190 [1994] [0149]
- Jennings et al., Microbiology 1999 145; 3013–3021 [0151]
- J. Exp. Med. 180: 2181–2190 [1994] [0151]
- Chu C. et al., Infect. Immunity, 1983, 245–256 [0183]
- Mitchell et al., Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18 (13): 4010 "Comparison of Pneumolysin genes and proteins from Streptococcus pneumoniae types 1 and 2." [0184]
- Mitchell et al., Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007 (1): 67–72 "Expression of the pneumolysin gene in Escherichia coli: rapid purification and biological properties." [0184]
- Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64 (12): 5255–62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae" [0184]
- Infect. Immun. 1996 64: 3544 [0184]
- Sanchez-Beato et al., FEMS Microbiol Lett 1998, 164: 207–14 [0184]
- Helminen ME, et al., (1993) Infect. Immun. 61: 2003–2010 [0186]
- R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915–920 [0196]
- Mathers et al., FEMS Immunol Med Microbiol 1997 19; 231–236 [0198]
- Myers et al., Infect Immun 1998 66; 4183–4192 [0198]
- Du et al., Infect Immun 1998 66; 3656–3665 [0198]
- Aebi et al., Infect Immun 1997 65; 4367 bis 4377 [0198]
- Sethi et al., Infect. Immun. 1997 65; 3666–3671 [0198]
- St Geme et al., Infect Immun 1998 66; 364–368 [0198]
- St Geme et al., J. Bacteriol. 2000 182; 6005–6013 [0198]
- Grau-Owen et al Infect Immun 1995 63; 1201–1210 [0198]
- Schryvers et al., 1989, 29: 121–130 [0198]
- Fleishmann et al., Science 1995 269; 496–512 [0198]
- Cope et al., Immun 2000 68 Infect; 4092–4101 [0198]
- Maciver et al., Infect Immun 1996 64; 3703–3712 [0198]
- Jin et al., Infect Immun 1996 64; 3134–3141 [0198]
- Cope et al., Mol Microbiol 1994 13; 863–873 [0198]
- Cope et al., Infect Immun 2001 69; 2353–2363 [0198]
- Tettelin et al., Science 2000 287; 1809–1815 [0198]
- "The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York [0201]
- Wolff et al., Science, (1990) 247: 1465–8 [0213]
- Harlow und Lane Antibodies; A Laboratory Manual 1988 [0225]
- Köhler und Milstein 1975 Nature 256; 495; Antibodies – a laboratory manual Harlow und Lane 1988 [0231]
- Vaughan TJ et al., 1998, Nature Biotechnology 16; 535 [0231]
- Jones & Winistofer (1992) [0238]
- Henderson et al., (1998), Trends Microbiol. 6: 370–378 [0245]
- Hoiczuk et al., (2000), EMBO 22: 5989–5999 [0245]
- Pizza et al., (2000), Science 287: 1816–1820 [0245]
- Pizza et al. (2000), Science 287: 1816–1820 [0246]
- Thompson et al., (1993) J. Bacteriol. 175: 811–818 [0252]
- Thompson et al., (1993) Infect. Immun. 61: 2906–2911 [0252]
- pMG-Derivat, Proc Natl Acad Sci U S A 1985 Jan, 82 (1): 88–92 [0254]
- Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor Press 1989 [0254]
- Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989 [0254]

Schutzansprüche

1. Immunogene Zusammensetzung, umfassend:
 - (i) ein Neisseria-Autotransporterprotein-Antigen, das NadA oder Hsf ist;
 - (ii) ein Neisseria-Eisenaufnahmeprotein-Antigen, das Lipo28 oder TbpA ist; und
 - (iii) eine Vesikelzusammensetzung der äußeren Membran, umfassend LPS-Immunityp L3;und wobei die genannten Antigene, soweit in einem Vesikel der äußeren Membran vorhanden, in dem Vesikel der äußeren Membran hochreguliert sind.
2. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Neisseria-Autotransporterprotein-Antigen und das Neisseria-Eisenaufnahmeprotein-Antigen isoliert sind.
3. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die genannte immunogene Zusammensetzung sowohl eine Zusammensetzung aus Untereinheiten als auch eine Vesikelzusammensetzung der äußeren Membran umfasst.
4. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, wobei die Vesikelzusammensetzung der äußeren Membran den LPS-Immunityp L3,7,9 umfasst.
5. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, wobei die Vesikelzusammensetzung der äußeren Membran eine Konzentration des LPS-Immunityps L3 umfasst, die unter Verwendung von Extraktion mit 0,02–0,4% Desoxycholat erreichbar ist.
6. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, wobei mindestens eines der Neisseria-Antigene von Neisseria meningitidis abgeleitet ist.
7. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei sämtliche Neisseria-Antigene von Neisseria meningitidis abgeleitet sind.
8. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, umfassend weiter ein oder mehrere bakterielle Kapselpolysaccharide oder -oligosaccharide.
9. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei die Kapselpolysaccharide oder -oligosaccharide von Bakterien abgeleitet sind, die aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus: Neisseria meningitidis Serotyp A, C, Y und W-135.
10. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, umfassend weiter ein Adjuvans.
11. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei das Adjuvans ein Aluminiumsalz umfasst.
12. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das Aluminiumsalz ein Aluminiumhydroxidgel ist.
13. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, wobei das Neisseria-Autotransporterprotein-Antigen NadA ist.
14. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, wobei das Neisseria-Autotransporterprotein-Antigen Lipo28 ist.
15. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, umfassend ein weiteres Antigen, das ein membranassoziiertes Protein aus Neisseria ist.
16. Immunogene Zusammensetzung nach einem vorangehenden Anspruch, umfassend ein weiteres Antigen, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: GNA1870, Hap, LbpB und Omp85.
17. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16, wobei das weitere Antigen isoliert ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1

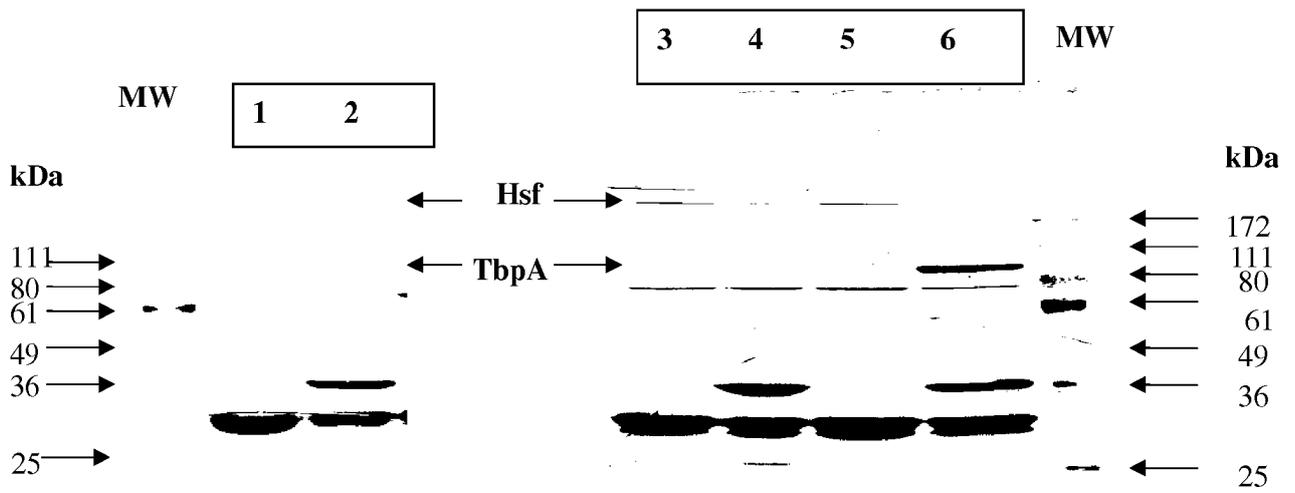


Abbildung 2

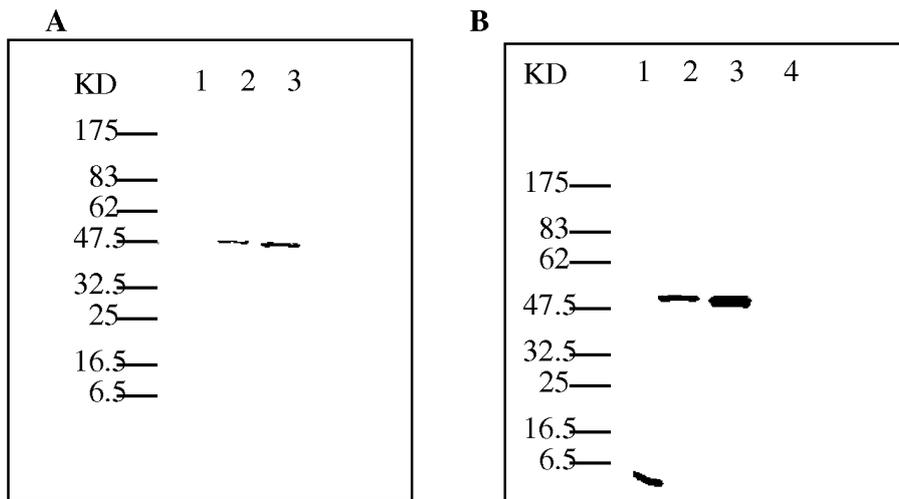


Abbildung 3

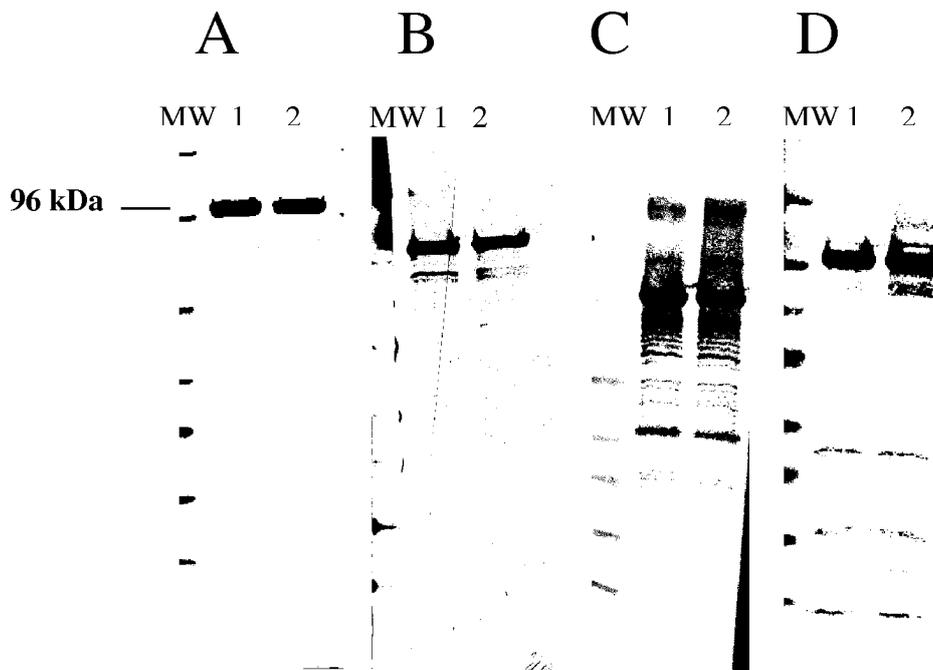


Abbildung 4

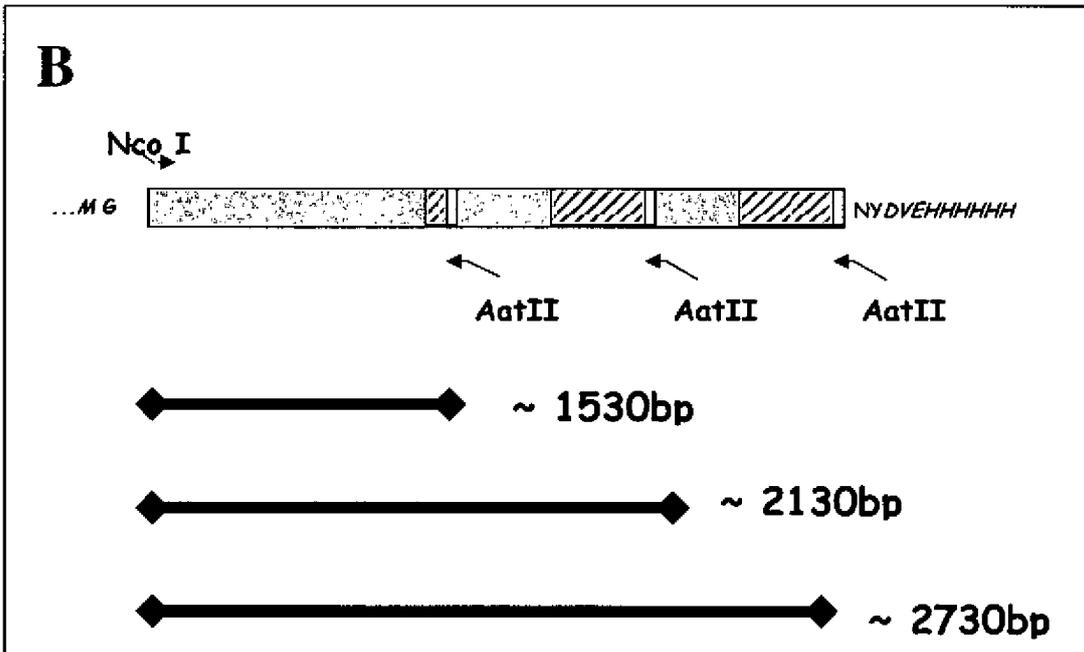
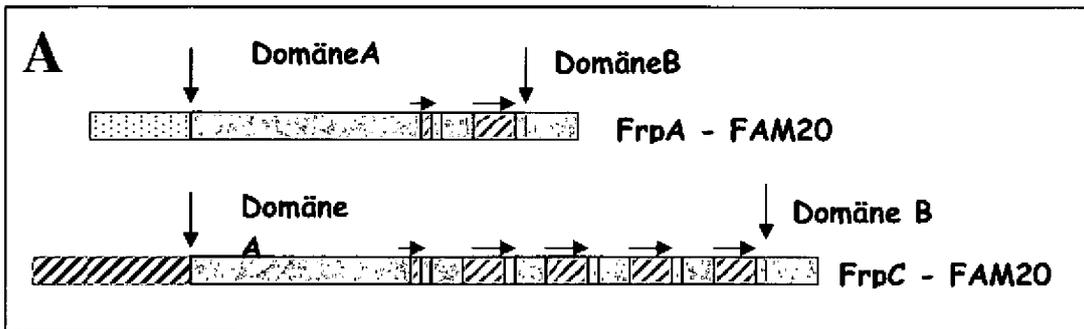


Abbildung 5

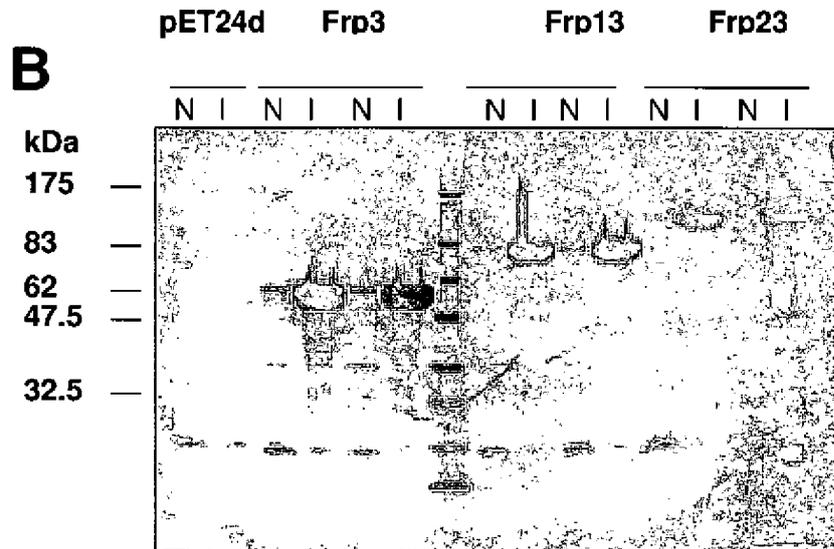
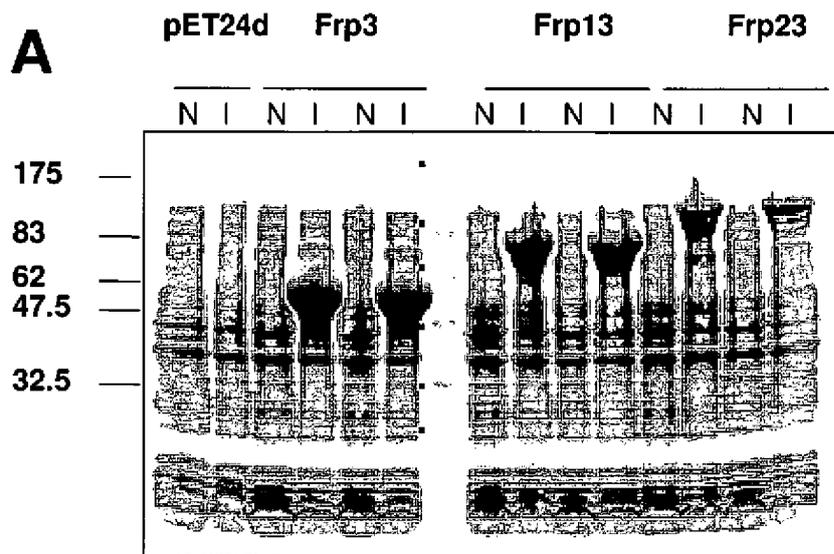


Abbildung 6

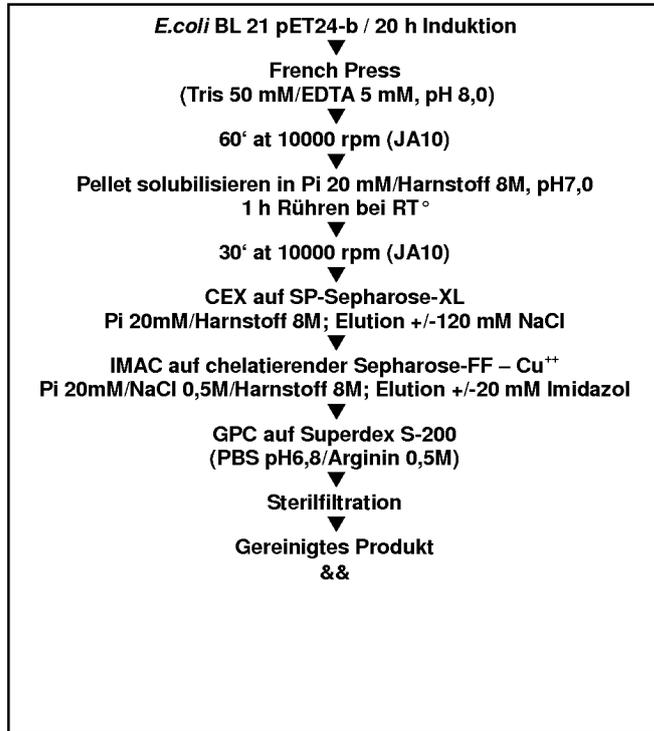
5' -

ATGAATAAAGTTTACATCGCATTATCTTTAGTAAAAAGCACAGCACCATGGTTGCAGTAGCCGAAACTGCCAACAGCCAGGG
 CAAAGGTAAACAGGCAGGCAGTTCGGTTTTCTGTTTCACTGAAAACCTTCAGGCGACCTTTGCGGCAAACCTCAAACCACCCCTTA
 AAACCTTGGTCTGCTCTTTGGTTTTCCCTGAGTATGGTATTGCTTGCCTATGCCCAAATTACCACCGACAAATCAGCACCTAAA
 AACCAGCAGGTCGTTATCCTTAAAAACCAACACTGGTGGCCCCCTGGTGAATATCCAAACTCCGAATGGACGCGGATTGAGCCA
 CAACCGCTATACGCAGTTTGTATGTTGACAACAAAGGGGCAGTGTAAACAACGACCGTAACAATAATCCGTTTGTGGTCAAAG
 GCAGTGGCAATTGATTTTGAACGAGGTACGCGGTACGGCTAGCAAACCTCAACGGCATCGTTACCGTAGGCGGTCAAAGGCC
 GACGTGATTATTGCCAACCCCAACGGCATTACCGTTAATGGCGGCGGCTTTAAAAATGTCGGTTCGGGGCATCTTAACTACCGG
 TCGCCCCAAATCGGCAAAGACGGTGCCTGACAGGATTTGATGTGCGTCAAGGCACATTGACCGTAGGAGCAGCAGGTTGGA
 ATGATAAAGGCGGAGCCGACTACACCGGGTACTTGCCTGTCAGTTGCTTTGCAGGGGAAATTACAGGGTAAAAACCTGGCG
 GTTCTTACCGGTCCTCAGAAAGTAGATTACGCCAGCGGCGAAATCAGTGCAGGTACGGCAGCGGGTACGAAACCGACTATTGC
 CCTTGATACTGCCGACTGGGCGGTATGTACGCCGACAGCATCACACTGATTGCCAATGAAAAAGGCGTAGGCGTCAAAAATG
 CCGGCACACTCGAAGCGGCCAAGCAATTGATTGTGACTTCGTGAGCCGATTGAAAAACAGCGGCCGCATCGCCACCCTGCC
 GACGGCACCGAAGCTTACCGACTTATCTCTCCATCGAAACCACCGAAAAAGGAGCGGCAGGCACATTTATCTCCAATGGTGG
 TCGGATCGAGAGCAAAGGCTTATTGGTTATTGAGACGGGAGAAGATATCAGCTTGCCTAACGGAGCCGTGGTGCAGAATAACG
 GCAGTCGCCAGCTACCACGGTATTAATGCTGGTCATAATTTGGTGAATTGAGAGCAAACATAATGTGAACAATGCCAAAGGC
 CCGGCTACTCTGTGCGCCGACGGCCGTACCGTCATCAAGGAGGCCAGTATTGAGACTGGCACTACCGTATACAGTTCCAGCAA
 AGGCAACGCCGAATTAGGCAATAACACACGCATTACCGGGGCGAGATGTTACCGTATTATCCAACGGCACCATCAGCAGTTCCG
 CCGTAATAGATGCCAAAGACACCGCACACATCGAAGCAGGCAAACCGCTTTCTTTGGAAGCTTCAACAGTTACCTCCGATATC
 CGCTTAAACGGAGGCAGTATCAAGGGCGGCAAGCAGCTTGCTTACTGGCAGACGATAACATTACTGCCAAAACCTACCAATCT
 GAATACTCCCGCAATCTGTATGTTTATACAGGTAAGATCTGAATTTGAATGTTGATAAAGATTTGTCTGCCGCCAGCATCC
 ATTTGAAATCGGATAACCGTGCCTATATTACCGGCACCAGTAAAACCTTACTGCCTCAAAGACATGGGTGTGGAGGCAGGC
 TCGCTGAATGTTACCAATACCAATCTGCGTACCAACTCGGGTAATCTGCACATTCAGGCAGCCAAAGGCAATATTCAGCTTCG
 CAATACCAAGCTGAACGCAGCCAAGGCTCTCGAAACCACCGCATTGCAGGGCAATATCGTTTTAGACGGCCTTATGCTGTTTT
 CTGCAGACGGTCAITGATCCTTATTGGCCAACGGTAATGCGGACTTTACCGGTACAAATACCCTGACAGCCAAGGCCGATGTC
 AATGCAGGATCGGTTGGTAAAGGCCGTCTGAAAGCAGACAATACCAATATCACTTCATCTTACAGGAGATATTACGTTGGTTGC
 CGGCAACGGTATTGAGCTTGGTGACGGAAAACAACGCAATCAATCAACGGAAAACACATCAGCATCAAAAACAACGGTGGTA
 ATGCCGACTTAAAAAACCTTAACGTCCATGCCAAAAGCGGGCATTGAACATTCATTCCGACCGGGCATTGAGCATAGAAAAT
 ACCAAGCTGGAGTCTACCCATAATACGCATCTTAATGCACAACACGAGCGGGTAACGCTCAACCAAGTAGATGCCACGCACA
 CCGTCATCTAAGCATTACCGGCAGCCAGATTTGGCAAACGACAAAACCTGCCTTCTGCCAACAAAGCTGGTGGCTAACGGTGTAT
 TGGCACTCAATGCGCGCTATTCCCAAATTGCCGACAACACCACGCTGAGAGCGGGTGAATCAACCTTACTGCCGGTACCGCC
 CTAGTCAAGCGCGGCAACATCAATTGGAGTACCGTTTTGACCCAAAACCTTTGGAAGATAATGCCGAATTAACCATTGGCCGG
 ACGGCTGAATATTGAAGCAGGTAGCGGCACATTAACCATCGAACCTGCCAACCGCATCAGTGCGCATACCGACCTGAGCATCA
 AACAGGCGGAAAATTGCTGTTGTCTGCAAAGGAGGAAATGCAGGTGCGCCTAGTGTCAAGTTTCTCATTGGAAGCAAAA
 GGCAATATCCGCTCGGTTACAGGAGAAACAGATTTAAGAGGTTCTAAAATTACAGCCGGTAAAAACTTGGTTGTGCGCCACCAC
 CAAAGGCAAGTTGAATATCGAAGCCGTAAACAACCTCATTGAGCAATATTTTCTACACAAAAAGCGGCTGAACTCAACCAAAA
 AATCCAAAGAATTGGAACAGCAGATTGCGCAGTTGAAAAAAGCTCGCCTAAAAGCAAGCTGATTCCAACCCTGCAAGAAGAA
 CGCGACCGTCTCGCTTTCTATATTCAAGCCATCAACAAGGAAGTTAAAGGTAAAAAACCCAAAGGCAAAGAATACCTGCAAGC

CAAGCTTTCTGCACAAAATATTGACTTGATTTCCGCACAAGGCATCGAAATCAGCGGTTCCGATATTACCGCTTCCAAAAAAC
TGAACCTTCACGCCGAGGCGTATTGCCAAAGGCAGCAGATTCAGAGGCGGCTGCTATTCTGATTGACGGCATAACCGACCAA
TATGAAATTGGCAAGCCACCTACAAGAGTCACTACGACAAAGCTGCTCTGAACAAGCCTTCACGTTTGACCGGACGTACAGG
GGTAAGTATTCATGCAGCTGCGGCACTCGATGATGCACGTATTATTATCGGTGCATCCGAAATCAAAGCTCCCTCAGGCAGCA
TAGACATCAAAGCCCATAGTGATATTGTACTGGAGGCTGGACAAAACGATGCCTATACCTTCTTAAAAACCAAAGGTAAAAGC
GGCAAAATCATCAGAAAAACCAAGTTTACCAGCACCCGCGACCACCTGATTATGCCAGCCCCGTCGAGCTGACCGCCAACGG
CATAACGCTTCAGGCAGGCGGCAACATCGAAGCTAATACCACCCGCTTCAATGCCCTGCAGGTAAAGTTACCCTGGTTGCGG
GTGAAGAGCTGCAACTGCTGGCAGAAGAAGGCATCCACAAGCACGAGTTGGATGTCCAAAAAAGCCGCCGCTTTATCGGCATC
AAGGTAGGCAAGAGCAATTACAGTAAAAACGAACGAAACGAAACCAAATTGCCTGTCCGCGTCGTCGCCAAACTGCAGCCAC
CCGTTCAGGCTGGGATACCGTGCTCGAAGGTACCGAATTCAAAACCACGCTGGCCGGTGCAGGACATTAGGCAGGTGTAGGCG
AAAAAGCCCGTGCCGATGCGAAAATTATCCTCAAAGGCATTGTGAACCGTATCCAGTCGGAAGAAAAATTAGAAACCAACTCA
ACCGTATGGCAGAAACAGGCCGGACGCGGCAGCACTATCGAAACGCTGAAACTGCCAGCTTCGAAAGCCCTACTCCGCCAA
ACTGACCGCCCCCGTGGCTATATCGTCGACATTCCGAAAGGCAATTTGAAAACCGAAATCGAAAAGCTGGCCAAACAGCCCG
AGTATGCCTATCTGAAACAGCTCCAAGTAGCGAAAAACACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTA STOP -3'

Abbildung 7

A



B

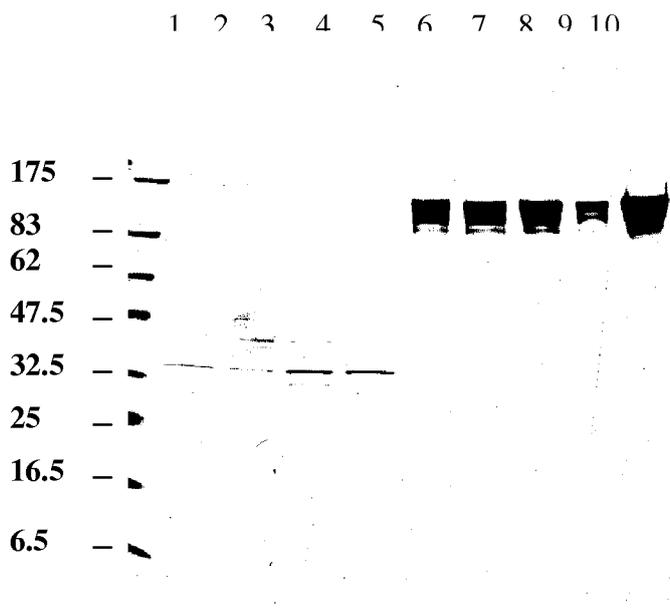


Abbildung 8 A

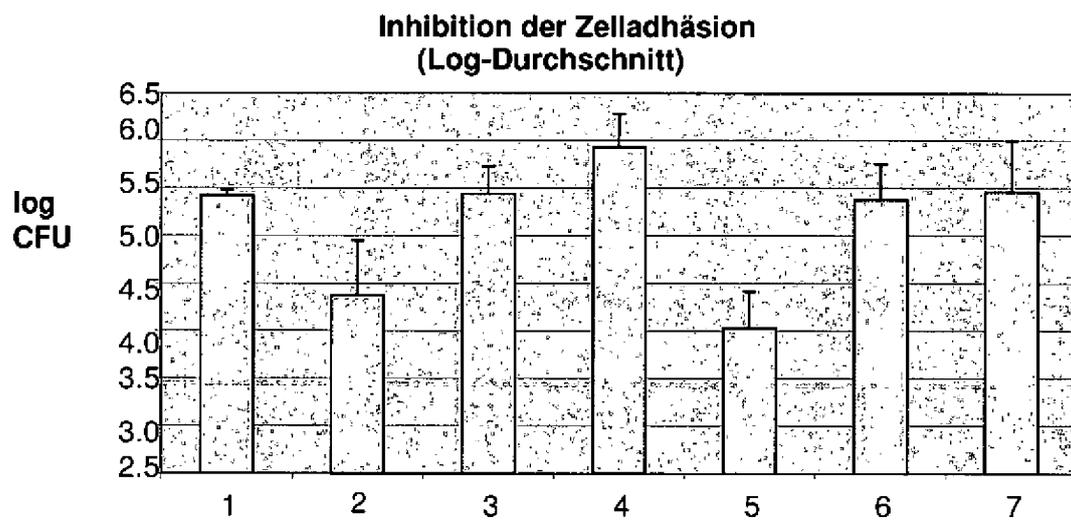


Abbildung 8 B

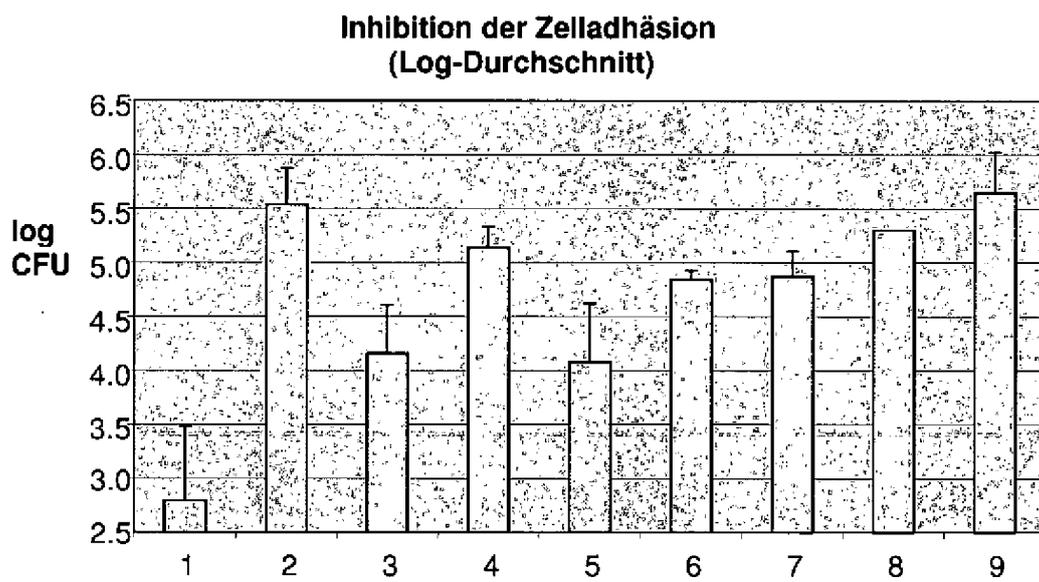


Abbildung 9

