



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0612670-7 A2**

(22) Data de Depósito: 23/06/2006
(43) Data da Publicação: 30/11/2010
(RPI 2082)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/095
A61K 39/102
A61K 39/116
A61P 31/04

(54) Título: **COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, E, KIT DE VACINA PARA A ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE OU SEQUENCIAL**

(30) Prioridade Unionista: 27/06/2005 GB 0513069.5, 27/06/2005 GB 0513071.1, 28/07/2005 GB 0515556.9, 28/11/2005 GB 0524204.5, 21/12/2005 GB 0526040.1, 21/12/2005 GB 0526041.9, 28/11/2005 GB 0524204.5, 21/12/2005 GB 0526040.1, 21/12/2005 GB 0526041.9, 27/06/2005 GB 0513069.5, 27/06/2005 GB 0513071.1, 28/07/2005 GB 0515556.9, 28/11/2005 GB 0524204.5, 21/12/2005 GB 0526040.1, 21/12/2005 GB 0526041.9, 28/11/2005 GB 0524204.5

(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

(72) Inventor(es): CARINE CAPIAU, DOMINIQUE BOUTRIAU, JAN POOLMAN, PHILIPPE DENOEL, PIERRE DUVIVIER, RALPH LEON BIEMANS

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006006188 de 23/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/000314 de 04/01/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, E, KIT DE VACINA PARA A ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE OU SEQUENCIAL O presente pedido divulga uma composição imunogênica que compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um dos sorogrupos A, C, W135 e Y conjugados a uma proteína carreadora para produzir um conjugado de polissacarídeo capsular de *N. meningitidis*, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa.

“COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, E, KIT DE VACINA PARA A ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE OU SEQUÊNCIAL”

A presente invenção diz respeito às composições imunogênicas que compreendem polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* conjugados a uma proteína carreadora. Esta adicionalmente diz respeito às vacinas e kits de vacina que compreendem conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis*, processos para fabricar as composições imunogênicas e vacinas e ao uso das vacinas e composições imunogênicas da invenção em terapia. Está também diz respeito aos métodos de imunizar contra infecção Neisserial usando os conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis* e ao uso de conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis* na fabricação de um medicamento.

A *Neisseria meningitidis* é um patógeno humano Gram negativo que causa a meningite bacteriana. Com base no polissacarídeo capsular do organismo, doze sorogrupos de *N. meningitidis* foram identificados (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y e Z). O sorogrupo A (MenA) é a causa mais comum de doença epidêmica na África sub-saariana. Os sorogrupos B e C são responsáveis pela maioria dos casos em países em desenvolvimento, com o resto dos casos sendo causados pelo W135 e Y).

As composições imunogênicas que compreendem sacarídeos de *N. meningitidis* conjugados às proteínas carreadoras são conhecidas na técnica. por exemplo a WO 02/58737 divulga uma vacina que compreende polissacarídeos capsulares purificados de *N. meningitidis* sorogrupos A, C, W135 e Y conjugados a uma proteína carreadora. Entretanto, este pedido divulga que os polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* extraídos devem ser despolimerizados pelo aquecimento em uma solução de peróxido de

hidrogênio antes da conjugação.

A WO 03/07985 divulga vacinas conjugadas que compreendem sacarídeo de *N. meningitidis* selecionado dos sorogrupos A, C, W135 e Y. Os polissacarídeos capsulares meningocócicos são extraídos e
5 depois hidrolisados de modo que uma seleção de oligossacarídeos derivados dos polissacarídeos capsulares são usados para a conjugação a uma proteína carreadora.

A WO 04/103400 também divulga conjugado de polissacarídeo-proteína derivado de meningocócico multivalente contendo
10 polissacarídeos capsulares derivados de *N. meningitidis* sorogrupos A, C, W135 e Y. Este pedido divulga que, ao invés de usar o polissacarídeo capsular nativo grande, o uso de polissacarídeos meningocócicos de um tamanho menor é preferido. Esta sugere que os polissacarídeos capsulares são parcialmente despolimerizados usando condições oxidativas brandas para dar
15 um tamanho médio de menos do que 100.000 daltons, preferivelmente 12.000 a 25.000 daltons.

Permanece uma necessidade para desenvolver vacinas conjugadas contra meningite neisserial melhoradas. A presente invenção diz respeito ao fornecimento de um vacina conjugada de polissacarídeo
20 meningocócico na qual o tamanho dos polissacarídeos é maior do que aquele divulgado na literatura. O foco da técnica foi usar oligossacarídeos para a facilidade de produção de conjugado. Os inventores descobriram que pelo uso de conjugados de polissacarídeo nativos ou levemente ajustados, uma ou mais das seguintes vantagens podem ser constatada: 1) um conjugado tendo alta
25 imunogenicidade que seja filtrável; 2) a memória imune pode ser realçada (como no exemplo três); 3) a alteração da razão de polissacarídeo para proteína no conjugado tal que a razão de polissacarídeo para proteína (p/p) no conjugado possa ser aumentada (isto pode resultar em uma redução do efeito de supressão do carreador); 4) conjugados imunogênicos propensos à

hidrólise (tais como os conjugados MenA) podem ser estabilizados pelo uso de polissacarídeos maiores para a conjugação. O uso de polissacarídeos maiores pode resultar em mais reticulação com o carreador conjugado e portanto menos clivagem de sacarídeo livre do conjugado. As vacinas conjugadas descritas na técnica anterior tendem a despolimerizar os polissacarídeos antes da conjugação de modo a melhorar a conjugação. A presente invenção é direcionada a uma estratégia diferente e surpreendentemente mostra que as vacinas conjugadas meningocócicas que retêm um tamanho maior de polissacarídeo fornecem uma boa resposta imune contra doença meningocócica.

Conseqüentemente, em um aspecto da presente invenção é fornecida uma composição imunogênica que compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa.

De acordo com um outro aspecto da invenção é fornecida uma vacina que compreende a composição imunogênica da invenção e um carreador farmacêuticamente aceitável.

De acordo com um outro aspecto da invenção é fornecido um kit de vacina para a administração concomitante ou seqüencial que compreende duas composições imunogênicas multi-valentes para conferir proteção em um hospedeiro contra a doença causada pelo *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*, o dito kit compreendendo um primeiro recipiente que compreende:

- toxóide do tétano (TT),
- toxóide da difteria (DT), e
- componentes da coqueluche de célula integral ou acelulares

e um segundo recipiente que compreende:

polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que o tamanho médio do ou de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa.

De acordo com um outro aspecto da invenção é fornecido um processo para fabricar a composição imunogênica ou vacina da invenção que compreende a etapa de misturar polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, opcionalmente com um excipiente farmacêuticamente aceitável, em que o tamanho médio do ou de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa.

De acordo com um outro aspecto da invenção é fornecido um método de imunizar um hospedeiro humano contra doença causada pela *Neisseria meningitidis* que compreende administrar ao hospedeiro uma dose imunoprotetora da composição imunogênica ou vacina da invenção.

De acordo com um outro aspecto da invenção é fornecida uma composição imunogênica da invenção para o uso no tratamento ou prevenção de doença causada pela *Neisseria meningitidis*.

De acordo com um outro aspecto da invenção é fornecido um uso da composição imunogênica ou vacina da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças causadas pela *Neisseria meningitidis*.

Descrição das figuras

Figura 1 – A – Diagrama de barras mostrando respostas de GMC em um ELISA anti-MenY. ENYTT012 é um conjugado de MenY-TT preparado a partir do polissacarídeo MenY nativo. ENYTT014 é um

conjugado de MenY-TT preparado a partir de polissacarídeo MenY microfluidizado que sofreu 40 ciclos de microfluidização. ENYTT015bis é um conjugado de MenY-TT preparado a partir do polissacarídeo MenY microfluidizado que sofreu 20 ciclos de microfluidização.

- 5 - B – Diagrama de barras mostrando respostas de GMT em um ensaio de SBA anti-MenY. ENYTT012 é um conjugado de MenY-TT preparado a partir do polissacarídeo MenY nativo. ENYTT014 é um conjugado de MenY-TT preparado a partir do polissacarídeo MenY microfluidizado que sofreu 40 ciclos de microfluidização. ENYTT015bis é
10 um conjugado de MenY-TT preparado a partir do polissacarídeo MenY microfluidizado que sofreu 20 ciclos de microfluidização.

Descrição detalhada

- Uma composição imunogênica da invenção compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou
15 quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que o tamanho médio (peso molecular médio ponderado; Mw) de pelo menos um, dois, três ou quatro de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 60 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa.

- Em um aspecto independente da invenção, a composição
20 imunogênica compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que pelo menos um, dois, três ou quatro de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* é um polissacarídeo nativo ou é ajustado por um fator de até x1,5, x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 ou x10 em relação ao peso
25 molecular médio ponderado do polissacarídeo nativo.

Para os propósitos da invenção, “polissacarídeo nativo” refere-se a um polissacarídeo que não foi submetido a um processo, o propósito do qual é reduzir o tamanho do polissacarídeo. Um polissacarídeo pode se tornar levemente reduzido no tamanho durante os procedimentos de purificação

normais. Um tal polissacarídeo é ainda nativo. Apenas se o polissacarídeo fosse submetido às técnicas de ajuste o polissacarídeo não seria considerado nativo.

Para os propósitos da invenção, “ajustado por um fator de até x2” significa que o polissacarídeo é submetido a um processo intencional a reduzir o tamanho do polissacarídeo mas para reter um tamanho de mais do que a metade do tamanho do polissacarídeo nativo. X3, x4 etc. devem ser interpretados do mesmo modo isto é, o polissacarídeo é submetido a um processo intencional a reduzir o tamanho do polissacarídeo mas para reter um tamanho de mais do que um terço, um quarto, etc. do tamanho do polissacarídeo nativo respectivamente.

Em um aspecto da invenção, a composição imunogênica compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que pelo menos um, dois, três ou quatro ou de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* é polissacarídeo nativo.

Em um aspecto da invenção, a composição imunogênica compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que pelo menos um, dois, três ou quatro ou de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* é ajustado por um fator e até x1,5, x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 ou x10.

As composições imunogênicas da invenção opcionalmente compreendem conjugados de: polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* sorogrupo C (MenC), polissacarídeo capsular sorogrupo A (MenA), polissacarídeo capsular do sorogrupo W135 (MenW), polissacarídeo capsular do sorogrupo Y (MenY), polissacarídeos capsulares do sorogrupo C e Y (MenCY), polissacarídeos capsulares dos sorogrupos C e A (MenAC), polissacarídeos capsulares dos sorogrupos C e W (MenCW), polissacarídeo

capsular dos sorogrupos A e Y (MenAY), polissacarídeos capsulares dos sorogrupos A e W (MenAW), polissacarídeos capsulares dos sorogrupos W e Y (Men WY), polissacarídeo capsular dos sorogrupos A, C e W (MenACW), polissacarídeos capsulares dos sorogrupos A, C e Y (MenACY);
 5 polissacarídeos capsulares dos sorogrupos A, W135 e Y (MenAWY), polissacarídeos capsulares dos sorogrupos C, W135 e Y (MenCWY); ou polissacarídeos capsulares dos sorogrupos A, C, W135 e Y (MenACWY). Esta é a definição de “um, dois, três ou quatro”, ou “pelo menos um de” dos sorogrupos A, C, W e Y, ou de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* onde
 10 aqui mencionados

Em uma forma de realização, o tamanho médio (ou peso molecular) de pelo menos um, dois, três, quatro ou de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* é de 50 kDa a 1500 kDa, 50 kDa a 500 kDa, 50 kDa a 300 kDa, 101 kDa a 1500 kDa, 101 kDa a 500 kDa, ou 101 kDa a 300 kDa como
 15 determinado por MALLS.

Em um forma de realização, o polissacarídeo de MenA, onde presente, tem um peso molecular de 50 a 500 kDa, 50 a 100 kDa, 100 a 500 kDa, 55 a 90 kDa, 60 a 70 kDa ou 70 a 80 kDa ou 60 a 80 kDa como determinado por MALLS.

20 Em uma forma de realização, o polissacarídeo de MenC, onde presente, tem um peso molecular de 100 a 200 kDa, 50 a 100 kDa, 100 a 150 kDa, 101 a 130 kDa, 150 a 210 kDa ou 180 a 210 kDa como determinado por MALLS.

25 Em um forma de realização o polissacarídeo de MenY, onde presente, tem um peso molecular de 60 a 190 kDa, 70 a 180 kDa, 80 a 170 kDa, 90 a 160 kDa, 100 a 150 kDa ou 110 a 140 kDa, 50 a 100 kDa, 100 a 140 kDa, 140 a 170 kDa ou 150 a 160 kDa como determinado por MALLS.

Em uma forma de realização o polissacarídeo de MenW, onde presente, tem um peso molecular de 60 a 190 kDa, 70 a 180 kDa, 80 a 170

kDa, 90 a 160 kDa, 100 a 150 kDa, 110 a 140 kDa, 50 a 100 kDa ou 120 a 140 kDa como determinado por MALLS.

O peso molecular ou peso molecular médio de um polissacarídeo aqui refere-se ao peso molecular médio ponderado (Mw) do polissacarídeo medido antes da conjugação e é medido por MALLS.

A técnica MALLS é bem conhecida na técnica e é tipicamente realizada como descrito no exemplo 2. Para a análise de MALLS de sacarídeos meningocócicos, duas colunas (TSKG6000 e 5000PWxI TOSOH Bioscience) podem ser usadas em combinação e os sacarídeos são eluídos em água. Os sacarídeos são detectados usando um detector de dispersão de luz (por exemplo Wyatt Dawn DSP equipado com um laser de argônio de 10 mW a 488 nm) e um refratômetro interferométrico (por exemplo Wyatt Otilab DSP equipado com uma célula P100 e um filtro vermelho a 498 nm).

Em uma forma de realização os polissacarídeos de *N. meningitidis* são polissacarídeos nativos ou polissacarídeos nativos que foram reduzidos em tamanho durante um processo de extração normal.

Em uma forma de realização, os polissacarídeos de *N. meningitidis* são ajustados pela clivagem mecânica, por exemplo pela microfluidização ou sonicação. A microfluidização e a sonicação têm a vantagem de diminuir o tamanho dos polissacarídeos nativos maiores suficientemente para fornecer um conjugado filtrável. O ajuste é por um fator de não mais do que x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 ou x1,5.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica compreende conjugados de *N. meningitidis* que são fabricados a partir de uma mistura de polissacarídeos nativos e polissacarídeos que são ajustados por um fator de não mais do que x20. Por exemplo, os polissacarídeos de MenC e/ou MenA são nativos. Por exemplo, polissacarídeos de MenY e/ou MenW são ajustados por um fator de não mais do que x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 ou x1,5. Por exemplo, uma composição imunogênica contém um conjugado

fabricado a partir de MenY e/ou MenW e/ou MenC e/ou MenA que é ajustado por um fator de não mais do que x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 ou x1,5 e/ou é microfluidizado. Por exemplo, uma composição imunogênica contém um conjugado fabricado a partir de MenA e/ou MenC e/ou MenW e/ou MenY

5 nativos. Por exemplo, uma composição imunogênica compreende um conjugado fabricado a partir de MenC nativo. Por exemplo, uma composição imunogênica compreende um conjugado fabricado a partir de MenC e MenA nativos que é ajustado por um fator de não mais do que x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 ou x1,5 e/ou é microfluidizado. Por exemplo, uma composição

10 imunogênica compreende um conjugado fabricado a partir de MenC e MenY nativos que é ajustado por um fator de não mais do que x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 ou x1,5 e/ou é microfluidizado.

Em uma forma de realização, a polidispersividade do polissacarídeo é de 1 a 1,5, de 1 a 1,3, de 1 a 1,2, de 1 a 1,1 ou de 1 a 1,05 e

15 depois da conjugação a uma proteína carreadora, a polidispersividade do conjugado é de 1,0 a 2,5, de 1,0 a 2,0, de 1,0 a 1,5, de 1,0 a 1,2, de 1,5 a 2,5, de 1,7 a 2,2 ou de 1,5 a 2,0. Todas as medições de polidispersividade são por MALLS.

Os polissacarídeos são opcionalmente ajustados até 1,5, 2, 4,

20 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ou 20 vezes do tamanho do polissacarídeo isolados de bactérias.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende ainda um antígeno do sorogrupo B de *N. meningitidis*. O antígeno é opcionalmente um polissacarídeo capsular do sorogrupo B de *N.*

25 *meningitidis* (MenB) ou um derivado de polissacarídeo ou oligossacarídeo ajustado a partir deste. O antígeno é opcionalmente uma preparação da vesícula de membrana externa do sorogrupo B de *N. meningitidis* como descrito na EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 e WO 04/14419.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende ainda um sacarídeo capsular da *H. influenzae b* (Hib) conjugado a uma proteína carreadora.

O(s) polissacarídeo(s) de *N. meningitidis* (e opcionalmente o
5 sacarídeo capsular Hib) incluídos nas composições farmacêuticas da invenção
são conjugados a uma proteína carreadora tal como o toxóide do tétano,
fragmento C do toxóide do tétano, mutantes não tóxicos da toxina do tétano,
toxóide da difteria, CRM197, outros mutantes não tóxicos da toxina da
difteria [tais como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J.
10 Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 e
CRM107 e outras mutações descritas por Nicholls e Youle em Genetically
Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; a deleção ou
mutação de Glu-148 para Asp, Gln ou Ser e/ou Ala 158 para Gly e outras
mutações divulgadas na US 4709017 ou US 4950740; a mutação de pelo
15 menos um ou mais resíduos Lys 516, Lys 526, Phe 530 e/ou Lys 534 e outra
mutações divulgadas na US 5917017 ou US 6455673; ou fragmento
divulgado na US 5843711], pneumolisina pneumocócica, OMPC (proteína da
membrana externa meningocócica – usualmente extraída do sorogrupo B da
N. meningitidis – EP0372501), peptídeos sintéticos (EP0378881,
20 EP0427347), proteínas de choque térmico (WO 93/17712, WO 94/03208),
proteínas da coqueluche (WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas,
fatores de crescimento ou hormônios (WO 91/01146), proteínas artificiais que
compreendem epítomos de célula T CD4+ humana múltiplos de vários
antígenos derivados de patógeno (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31;
25 3816-3824) tal como a proteína N19 (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72;
4884-7) proteína PspA da superfície pneumocócica (WO 02/091998)
pneumolisina (Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13), proteínas da
captação de ferro (WO 01/72337), toxinas A ou B de *C. difficile* (WO
00/61761) ou Proteína D (EP594610 e WO 00/56360).

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção usa a mesma proteína carreadora (independentemente) em pelo menos dois, três, quatro ou de cada um dos polissacarídeos de *N. meningitidis*. Em uma forma de realização onde Hib está presente, Hib pode ser conjugado à mesma proteína carreadora como a de pelo menos um, dois, três, quatro ou de cada um dos polissacarídeos de *N. meningitidis*. Por exemplo, 1, 2, 3 ou 4 dos polissacarídeos de *N. meningitidis* são independentemente conjugados ao toxóide do tétano para fabricar 1, 2, 3 ou 4 conjugados.

Em uma forma de realização, uma única proteína carreadora pode carregar mais do que um antígeno de sacarídeo (WO 04/083251). Por exemplo, uma única proteína carreadora poderia ser conjugada a MenA e MenC; MenA e MenW; MenA e MenY; MenC e MenW; MenC e MenY; MenW e MenY; MenA, MenC e MenW; MenA, MenC e MenY; MenA, MenW e MenY; MenC, MenW e MenY; MenA, MenC, MenW e MenY; Hib e MenA; Hib e MenC; Hib e MenW; ou Hib e MenY.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende um polissacarídeo de *N. meningitidis* conjugados a uma proteína carreadora selecionada do grupo que consiste de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT e proteína D.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende um sacarídeo Hib conjugado a uma proteína carreadora selecionada do grupo que consiste de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT e proteína D.

A composição imunogênica da invenção opcionalmente compreende pelo menos um conjugado de sacarídeo meningocócico (por exemplo MenA; MenC; MenW; MenY; MenA e MenC; MenA e MenW; MenA e MenY; MenC e Men W; Men C e MenY; MenW e MenY; MenA, MenC e MenW; MenA, MenC e MenY; MenA, MenW e MwnY; MenC, MenW e MenY ou MenA, MenC, MenW e MenY) tendo uma razão de

sacarídeo Men para proteína carreadora dentre 1:5 e 5:1, entre 1:2 e 5:1, entre 1:0,5 e 1:2,5 ou entre 1:1,25 e 1:2,5 (p/p).

A composição imunogênica da invenção opcionalmente compreende um conjugado de sacarídeo Hib tendo uma razão de Hib para proteína carreadora dentre 1:5 e 5:1; 1:2 e 2:1; 1:1 e 1:4; 1:2 e 1:3,5; ou em torno de ou exatamente 1:2,5 ou 1:3 (p/p). Por 'em torno de' é intencionado dentro de 10 % da razão estabelecida.

A razão de sacarídeo para proteína carreadora (p/p) em um conjugado pode ser determinada usando o conjugado esterilizado. A quantidade de proteína é determinada usando um ensaio de Lowry (por exemplo Lowry et al (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 ou Peterson et al Analytical Biochemistry 100, 201-220 (1979)) e a quantidade de sacarídeo é determinada usando ICP-OES (espectroscopia de emissão plasma-ótica indutivamente ligado) para MenA, os ensaios de DMAP para MenC e o ensaio de Resorcinol para MenW e MenY (Monsigny et al (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530).

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção, o(s) polissacarídeo(s) de *N. meningitidis* e/ou o sacarídeo de Hib são conjugados à proteína carreadora por intermédio de um ligador, por exemplo um ligador bifuncional. O ligador é opcionalmente heterobifuncional ou homobifuncional, tendo por exemplo um grupo amino reativo e um grupo de ácido carboxílico reativo, 2 grupos amino reativos ou dois grupos de ácido carboxílico reativos. O ligador tem por exemplo entre 4 e 20, 4 e 12, 5 e 10 átomos de carbono. Um ligador possível é ADH. Outros ligadores incluem B-propionamido (WO 00/ 10599), nitrofenil-etilamina (Geyer et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haletos de haloalquila (US4057685), ligações glicosídicas (US4673574, US4808700), hexano diamina e ácido 6-aminocapróico (US4459286).

Os conjugados de polissacarídeo presentes nas composições

imunogênicas da invenção podem ser preparados por qualquer técnica de ligação conhecida. O método de conjugação pode contar com a ativação do sacarídeo com tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridínio (CDAP) para formar um éster de cianato. O sacarídeo ativado pode ser assim ligado
5 diretamente ou por intermédio de um grupo espaçador (ligador) um grupo amino na proteína carreadora. Por exemplo, o espaçador pode ser cistamina ou cisteamina para dar um polissacarídeo tiolado que pode ser ligado ao carreador por intermédio de uma ligação de tioéter obtida depois da reação com uma proteína carreadora ativada por maleimida (por exemplo usando
10 GMBS) ou uma proteína carreadora holoacetilada (por exemplo usando iodoacetimida ou bromoacetatobromoacetato de N-succinimidila). Opcionalmente, o éster de cianato (opcionalmente fabricado pela química de CDAP) é ligado com hexano diamina ou ADH e o sacarídeo derivatizado por amino é conjugado à proteína carreadora usando carbodiimida (por exemplo,
15 a química de EDAC ou EDC). Tais conjugados são descritos no pedido publicado PCT WO 93/15760 Uniformed Services University e WO 95/08348 e WO 96/29094.

Outras técnicas adequadas usam carbimidas, hidrazidas, ésteres ativos, norborano, ácido p-nitrobenzóico, N-hidroxissuccinimida, S-
20 NHS, EDC, TSTU. Muitas são descritas na WO 98/42721. A conjugação pode envolver um ligador de carbonila que pode ser formado pela reação de um grupo hidroxila livre do sacarídeo com CDI (Bethel) et al J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn et al J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18) seguido pela reação com uma proteína para formar uma ligação de carbamato. Isto
25 pode envolver a redução do terminal anomérico para um grupo hidroxila primário, proteção/desproteção opcionais da reação do grupo hidroxila primário do grupo hidroxila primário com CDI para formar um intermediário de carbamato de CDI e ligando o intermediário de carbamato de CDI com um grupo amino em uma proteína.

Os conjugados também podem ser preparados pelos métodos de aminação redutiva direta como descrito na US 4365170 (Jennings) e US 4673574 (Anderson). Outros métodos são descritos na EP-0-161-188, EP-208375 e EP-0-477508.

5 Um outro método envolve a ligação de um sacarídeo ativado por brometo de cianogênio (ou CDAP) derivatizado com hidrazida de ácido adípico (ADH) à proteína carreadora pela condensação de Carbodiimida (Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256), por exemplo usando EDAC.

10 Em uma forma de realização, um grupo hidroxila (opcionalmente um grupo hidroxila ativado por exemplo um grupo hidroxila ativado por um éster de cianato) em um sacarídeo é ligado a um grupo amino ou carboxílico em uma proteína direta ou indiretamente (através de um ligador). Onde um ligador está presente, um grupo hidroxila em um sacarídeo está opcionalmente ligado a um grupo amino em um ligador, por exemplo
15 pelo uso da conjugação de CDAP. Um outro grupo amino no ligador por exemplo ADH) pode ser conjugado a um grupo de ácido carboxílico em uma proteína, por exemplo usando-se a química da carbodiimida, por exemplo usando-se EDAC. Em uma forma de realização, o(s) polissacarídeo(s) capsular(es) de Hib ou *N. meningitidis* é/são conjugados ao primeiro ligador
20 antes que o ligador seja conjugado à proteína carreadora.

Em uma forma de realização, o sacarídeo de Hib, onde presente, é conjugado à proteína carreadora usando CNBr, ou CDAP, ou uma combinação de CDAP e a química da carbodiimida (tal como EDAC), ou uma combinação de CNBr e a química da carbodiimida (tal como EDAC).
25 Opcionalmente Hib é conjugado usando CNBr e a química da carbodiimida, opcionalmente EDAC. Por exemplo, CNBr é usado para unir o sacarídeo e o ligador e depois a química da carbodiimida é usada para unir o ligador à proteína carreadora.

Em uma forma de realização, pelo menos um dos

polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* está diretamente conjugado a uma proteína carreadora; opcionalmente os sacarídeos MenW e/ou MenY e/ou MenC estão diretamente conjugados a uma proteína carreadora. Por exemplo MenW; MenY; MenC; MenW e MenY; MenW e MenC; MenY e MenC; ou MenW, MenY e MenC estão diretamente ligados à proteína carreadora. Opcionalmente o pelo menos um dos polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* está diretamente conjugado pelo CDAP. Por exemplo MenW; MenY; MenC; MenW e MenY; MenW e MenC; MenY e MenC; ou MenW, MenY e MenC estão diretamente ligados à proteína carreadora pelo CDAP (ver a WO 95/08348 e WO 96/29094). Em uma forma de realização, todos os polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* estão conjugados ao toxóide do tétano.

Opcionalmente a razão de sacarídeo Men W e/ou Y para proteína carreadora está entre 1:0,5 e 1:2 (p/p) e/ou a razão de sacarídeo MenC para proteína carreadora está entre 1:0,5 e 1:4 ou de 1:1,25 a 1:1,5 ou 1:0,5 e 1:1,5 (p/p), especialmente onde estes sacarídeos estão diretamente ligados à proteína, opcionalmente usando CDAP.

Em uma forma de realização, pelo menos um dos polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* é conjugado à proteína carreadora por intermédio de um ligador, por exemplo um ligador bifuncional. O ligador é opcionalmente heterobifuncional ou homobifuncional, tendo por exemplo um grupo de amina reativo e um grupo de ácido carboxílico reativo, 2 grupos de amina reativos ou 2 grupos de ácido carboxílico reativos. O ligador tem por exemplo entre 4 e 20, 4 e 12, 5 e 10 átomos de carbono. Um ligador possível é ADH.

Em uma forma de realização, MenA; MenC; ou MenA e MenC são conjugados a uma proteína carreadora (por exemplo toxóide do tétano) por intermédio de um ligador.

Em uma forma de realização, pelo menos um polissacarídeo de

N. meningitidis é conjugado a uma proteína carreadora por intermédio de um ligador usando CDAP e EDAC. Por exemplo, MenA; MenC; ou MenA e MenC são conjugados a uma proteína por intermédio de um ligador (por exemplo aqueles com dois grupos hidrazino nas suas extremidades tais como ADH) usando CDAP e EDAC como descrito acima. Por exemplo, CDAP é usado para conjugar o sacarídeo a um ligador e EDAC é usado para conjugar o ligador a uma proteína. Opcionalmente a conjugação por intermédio de um ligador resulta em uma razão de polissacarídeo para proteína carreadora dentre 1:0,5 e 1:6; 1:1 e 1:5 ou 1:2 e 1:4, para MenA; MenC; ou MenA e MenC.

Em uma forma de realização, o polissacarídeo capsular MenA, onde presente é pelo menos parcialmente O-acetilado tal que pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 98 % das unidades de repetição sejam O-acetiladas em pelo menos uma posição. A O-acetilação está por exemplo presente pelo menos na posição de O-3 de pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 98 % das unidades de repetição.

Em uma forma de realização, o polissacarídeo capsular MenC, onde presente é pelo menos parcialmente O-acetilado tal que pelo menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 98 % das unidades de repetição de NeuNAc ligados ($\alpha 2 \rightarrow 9$) são O-acetiladas em pelo menos uma ou duas posições. A O-acetilação está por exemplo presente nas posições O-7 e/ou O-8 de pelo menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 98 % das unidades de repetição.

Em uma forma de realização, o polissacarídeo capsular MenW, onde presente é pelo menos parcialmente O-acetilado tal que pelo menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 98 % das unidades de repetição sejam O-acetiladas em pelo menos uma ou duas posições. A O-acetilação está por exemplo presente nas posições O-7 e/ou O-9 de pelo menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 98 %

das unidades de repetição.

Em uma forma de realização, o polissacarídeo capsular MenY, onde presente é pelo menos parcialmente O-acetilado tal que pelo menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 98 % das unidades de repetição sejam O-acetiladas em pelo menos uma ou duas posições. A O-acetilação está presente nas posições 7 e/ou 9 de pelo menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 98 % das unidades de repetição.

A porcentagem de O-acetilação refere-se à porcentagem das unidades de repetição contendo O-acetilação. Isto pode ser medido no polissacarídeo antes de conjugado e/ou depois da conjugação.

Em uma outra forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende um conjugado de sacarídeo de Hib e pelo menos dois conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis* em que o conjugado Hib está presente em uma dose de sacarídeo mais baixa do que a dose de sacarídeo média dos pelo menos dois conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis*. Alternativamente, o conjugado Hib está presente em uma dose de sacarídeo mais baixa do que a dose de sacarídeo de cada um dos pelo menos dois conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis*. Por exemplo, a dose do conjugado Hib pode ser pelo menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % ou 80 % mais baixa do que a dose de sacarídeo média ou mais baixa dos pelo menos dois outros conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis*.

O termo “sacarídeo” inclui polissacarídeos ou oligossacarídeos. Os polissacarídeos são isolados de bactérias ou isolados de bactérias e ajustados em algum grau pelos métodos conhecidos (ver por exemplo a EP497524 e EP497525) e opcionalmente pela microfluidização. Os polissacarídeos podem ser ajustados de modo a reduzir a viscosidade em amostras de polissacarídeo e/ou para melhorar a filtrabilidade de produtos conjugados. Os oligossacarídeos são caracterizados por serem tipicamente polissacarídeos hidrolisados com um número baixo de unidades de repetição

(tipicamente de 5 a 30 unidades de repetição).

A dose média é determinada adicionando-se as doses de todos os outros polissacarídeos e dividindo-se pelo número de outros polissacarídeos. Outros polissacarídeos são todos os polissacarídeos dentro da
5 composição imunogênica com exceção de Hib e podem incluir polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis*. A “dose” é na quantidade de composição imunogênica ou vacina que é administrada a um ser humano.

Um sacarídeo Hib é o polissacarídeo capsular de fosfato de polirribosila (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b ou um oligossacarídeo
10 derivado deste.

Pelo menos dois outros conjugados de sacarídeo bacteriano deve ser interpretado como significando pelo menos dois outros conjugados de sacarídeo bacteriano além de um conjugado de Hib. Os pelo menos dois outros conjugados bacterianos podem incluir conjugados de polissacarídeo capsular de *N. meningitidis*.
15

As composições imunogênicas da invenção podem compreender outros conjugados de sacarídeo derivados de um ou mais de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococci* do Grupo A, *Streptococci* do Grupo B, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*. Em uma forma de realização, a composição imunogênica
20 compreende polissacarídeos capsulares ou oligossacarídeos derivados de um ou mais dos sorogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Uma outra forma de realização compreende polissacarídeos capsulares ou oligossacarídeos derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Os antígenos de
25 polissacarídeo capsular ou oligossacarídeo pneumocócicos são opcionalmente selecionados dos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F (opcionalmente de sorotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F). Uma outra forma de realização compreende os polissacarídeos capsulares ou oligossacarídeos Tipo

5, Tipo 8 ou 336 de *Staphilococcus aureus*. Uma outra forma de realização compreende os polissacarídeos capsulares Tipo I, Tipo II ou Tipo III de *Staphilococcus epidermidis*. Uma outra forma de realização compreende o sacarídeo VI (poli ou oligossacarídeo) de *S. typhi*. Uma outra forma de realização compreende os polissacarídeos capsulares ou oligossacarídeos Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II, Tipo III ou Tipo V de estreptococo do Grupo B. Uma outra forma de realização compreende os polissacarídeos capsulares ou oligossacarídeos de estreptococo do Grupo A, opcionalmente ainda compreendendo pelo menos uma proteína M e opcionalmente tipos múltiplos de proteína M.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção contém cada polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* em uma dose dentre 0,1 e 204; 1 e 104; 2 e 10 µg, 2,5-5 µg, em torno de ou exatamente 5 µg; ou em torno de ou exatamente 2,5 µg.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção por exemplo contém o conjugado de sacarídeo de Hib em uma dose de sacarídeo entre 0,1 e 9 µg; 1 e 5 µg ou 2 e 3 µg ou em torno de ou exatamente 2,5 µg e cada um dos conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis* em uma dose de sacarídeo dentre 2 e 20 µg, 3 e 10 µg, ou entre 4 e 7 µg ou em torno de ou exatamente 5 µg.

“Em torno de” ou “aproximadamente” são definidos como dentro de 10 % mais ou menos da figura dada para os propósitos da invenção.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção contém uma dose de sacarídeo do conjugado de sacarídeo de Hib que é por exemplo menor do que 90 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % ou 10 % da dose de sacarídeo média de pelo menos dois, três, quatro ou de cada um dos conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis*. A dose de sacarídeo do sacarídeo Hib está por exemplo entre 20 % e 60 %, 30 % e 60 %, 40 % e 60 % ou em torno de ou exatamente 50 % da dose de

sacarídeo média de pelo menos dois, três, quatro ou de cada um dos conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis*.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção contém uma dose de sacarídeo do conjugado de sacarídeo de Hib
 5 que é por exemplo menor do que 90 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % ou 10 % da dose de sacarídeo mais baixa do pelo menos dois, três, quatro ou de cada um dos conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis*. A dose de sacarídeo do sacarídeo Hib está por exemplo entre 20 % e 60 %, 30 % e 60 %, 40 % e 60 % ou em torno de ou exatamente 50 % da
 10 dose de sacarídeo mais baixa do pelo menos dois, três, quatro ou de cada um dos conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis*.

Em uma forma de realização da invenção, a dose de sacarídeo de cada um dos pelo menos dois, três, quatro ou de cada um dos conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis* é opcionalmente a mesma ou
 15 aproximadamente a mesma.

Os exemplos de composições imunogênicas da invenção são composições que consistem de ou que compreendem:

Conjugado de Hib e conjugado de MenA e conjugado de MenC, opcionalmente em taxas de dose de sacarídeo de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2,
 20 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, a dose de sacarídeo de MenA é maior do que a dose de sacarídeo de MenC.

O conjugado de Hib e o conjugado de MenC e o conjugado de MenY, opcionalmente em taxas de dose de sacarídeo de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, a dose de
 25 sacarídeo de MenC é maior do que a dose de sacarídeo de MenY.

O conjugado de Hib e o conjugado de MenC e o conjugado de MenW, opcionalmente em taxas de dose de sacarídeo de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente a dose de sacarídeo de MenC é maior do que a dose de sacarídeo de MenW.

O conjugado de Hib e o conjugado de MenA e o conjugado de MenW, opcionalmente em taxas de dose de sacarídeo de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, a dose de sacarídeo de MenA é maior do que a dose de sacarídeo de MenW.

5 O conjugado de Hib e o conjugado de MenA e o conjugado de MenY, opcionalmente em taxas de dose de sacarídeo de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente a dose de sacarídeo de MenA é maior do que a dose de sacarídeo de MenY.

10 O conjugado de Hib e o conjugado de MenW e o conjugado de MenY, opcionalmente em taxas de dose de sacarídeo de 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 1:4:2, 1:2:4, 1:4:1, 1:1:4, 1:3:6, 1:1:3, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente a dose de sacarídeo de MenY é maior do que a dose de sacarídeo de MenW.

15 MenA, MenC, MenW e MenY em taxas de dose de sacarídeo de 1:1:1:1 ou 2:1:1:1 ou 1:2:1:1 ou 2:2:1:1 ou 1:3:1:1 ou 1:4:1:1 (p/p).

Um outro aspecto da invenção é uma vacina que compreende a composição imunogênica da invenção e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

20 Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção é tamponada ou ajustada entre o pH 7,0 e 8,0, pH 7,2 e 7,6 ou em torno de ou exatamente no pH 7,4.

A composição imunogênica ou vacinas da invenção são opcionalmente liofilizadas na presença de um agente estabilizante por exemplo um poliol tal como sacarose ou trealose.

25 Opcionalmente, a composição imunogênica ou vacina da invenção contém uma quantidade de um adjuvante suficiente para realçar a resposta imune para o imunógeno. Os adjuvantes adequados incluem, mas não são limitados a, sais de alumínio (fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio), misturas de esqualeno (SAF-1), peptídeo muramila, derivados de

saponina, preparações de parede celular de micobactéria, monofosforil lipídeo A, derivados do ácido micólico, tensoativos de copolímero de bloco não iônico, Quil A, subunidade da toxina B do cólera, polifosfazeno e derivados, e complexos imunoestimulantes (ISCOMs) tais como aqueles descritos por
5 Takahashi et al. (1990) Nature 344: 873-875.

Para as combinações de *N. meningitidis* ou HibMen debatidas acima, pode ser vantajosos não usar qualquer adjuvante de sal de alumínio ou qualquer adjuvante de modo algum.

Como com todas as composições imunogênicas ou vacinas, as
10 quantidades imunologicamente eficazes dos imunógenos devem ser determinadas empiricamente. Os fatores a serem considerados incluem a imunogenicidade, seja o imunógeno complexado ou não com ou covalentemente ligado a um adjuvante ou proteína carreadora ou outro carreador, as vias de administração e o número de dosagens imunizadoras a
15 serem administradas. Tais fatores são conhecidos na técnica da vacina e está bem dentro da habilidade de imunologistas para fazer tais determinações sem a experimentação indevida.

O agente ativo pode estar presente em concentrações variáveis na composição farmacêutica ou vacina da invenção. Tipicamente, a
20 concentração mínima da substância é uma quantidade necessária para se obter o seu uso pretendido, enquanto que a concentração máxima é a quantidade máxima que permanecerá em solução ou homogeneamente colocada em suspensão dentro da mistura inicial. por exemplo, a quantidade mínima de um agente terapêutico é opcionalmente uma que fornecerá uma única dosagem
25 terapeuticamente eficaz. Para as substâncias bioativas, a concentração mínima é uma quantidade necessária para a bioatividade na reconstituição e a concentração máxima está no ponto em que uma suspensão homogênea não possa ser mantida. No caso de unidades de dose única, a quantidade é aquela de uma aplicação terapêutica única. No geral, é esperado que cada dose

compreenderá de 1 a 100 µg de antígeno de proteína, opcionalmente de 5 a 50 µg ou de 5 a 25 µg. Os exemplos de doses de sacarídeos bacterianos são de 10 a 20 µg, de 5 a 10 µg, de 2,5 a 5 µg ou de 1 a 2,5 µg. A quantidade preferida da substância varia de substância para substância mas é facilmente determinável por uma pessoa de habilidade na técnica.

As preparações de vacina da presente invenção podem ser usadas para proteger ou tratar um mamífero (por exemplo um paciente humano) suscetível à infecção, por meio da administração da dita vacina por intermédio da via sistêmica ou mucósica. Um paciente humano é opcionalmente um bebê (abaixo de 12 meses), uma criança entre um e três anos (12 a 24, 12 a 16 ou 12 a 14 meses), uma criança (2 a 10, 3 a 8 ou 3 a 5 anos) um adolescente (12 a 25, 14 a 21 ou 15 a 19 anos) ou um adulto (qualquer idade acima de 12, 15, 18 ou 21). Estas administrações podem incluir injeção por intermédio das vias intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea; ou por intermédio da administração mucósica aos tratos oral/alimentar, respiratório, genitourinário. A administração intranasal de vacinas para o tratamento de pneumonia ou otite média é preferida (visto que o transporte nasofaríngeo de pneumococos pode ser mais eficazmente prevenida, atenuando assim a infecção no seu estágio mais inicial). Embora a vacina da invenção possa ser administrada como uma dose única, os seus componentes também podem ser co-administrados juntos ao mesmo tempo ou em tempos diferentes (por exemplo se sacarídeos estão presentes em uma vacina estes podem ser administrados separadamente ao mesmo tempo ou 1 a 2 semanas depois da administração de uma vacina de proteína bacteriana para a coordenação ótima das respostas imunes com respeito a cada um). Além de uma via única de administração, 2 vias diferentes de administração podem ser usadas. Por exemplo, os antígenos virais podem ser administrados ID (intradérmico), enquanto que as proteínas bacterianas podem ser administradas IM (intramuscular) ou IN (intranasal). Se sacarídeos estão

presentes, estes podem ser administrados IM (ou ID) e as proteínas bacterianas podem ser administradas IN (ou ID). Além disso, as vacinas da invenção podem ser administradas IM para as doses de preparação e IN para as doses de reforço.

5 A preparação de vacina é no geral descrita em Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nova Iorque). A encapsulação dentro dos lipossomas é descrita por Fullerton, Patente US 4.235.877.

10 Um outro aspecto da invenção é um kit de vacina para a administração concomitante ou sequencial que compreende duas composições imunogênicas multi-valentes para conferir proteção em um hospedeiro contra doenças causadas pelo *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Neisseria meningitidis* e opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por exemplo, o kit opcionalmente compreende um
15 primeiro recipiente compreendendo uma ou mais de:

toxóide do tétano (TT),
toxóide da difteria (DT), e
componentes da de célula integral ou acelular
e um segundo recipiente que compreende:

20 polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa, opcionalmente liofilizados.

25 ou
conjugado de sacarídeo de Hib, e
polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N.*

meningitidis está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa, opcionalmente liofilizados.

Os exemplos de formulação do conjugado de Hib e os conjugados de polissacarídeo de *N. meningitidis* são como descritos acima.

5 Um outro aspecto da invenção é um kit de vacina para a administração concomitante ou seqüencial que compreende duas composições imunogênicas multi-valentes para conferir proteção em um hospedeiro contra a doença causada pela *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* e opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por exemplo, o kit opcionalmente
10 compreende um primeiro recipiente que compreende:

um ou mais conjugados de uma proteína carreadora e um sacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* [onde o sacarídeo capsular é opcionalmente de um sorotipo pneumocócico selecionado do grupo que consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F,
15 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F].

e um segundo recipiente que compreende:

polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N.*
20 *meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa, opcionalmente liofilizados.

ou

conjugado de sacarídeo de Hib, e

polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos
25 um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa, opcionalmente liofilizados.

Os exemplos do conjugado de Hib e os conjugados de

polissacarídeo de *N. meningitidis* são como descritos acima.

Tipicamente a vacina de *Streptococcus pneumoniae* no kit de vacina da presente invenção compreenderá antígenos de sacarídeo (opcionalmente conjugados), em que os polissacarídeos são derivados de pelo menos quatro sorotipos de pneumococos escolhidos do grupo que consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F. Opcionalmente os quatro sorotipos incluem 6B, 14, 19F e 23F. Opcionalmente, pelo menos 7 sorotipos são incluídos na composição, por exemplo aqueles derivados dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F. Opcionalmente mais do que 7 sorotipos são incluídos na composição, por exemplo pelo menos 10, 11, 12, 13 ou 14 sorotipos. Por exemplo a composição em uma forma de realização inclui 11 polissacarídeos capsulares derivados dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F (opcionalmente conjugados). Em uma forma de realização da invenção pelo menos 13 antígenos polissacarídicos (opcionalmente conjugados) são incluídos, embora outros antígenos polissacarídicos, por exemplo 23 valente (tais como os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F), também são considerados pela invenção.

Os sacarídeos pneumocócicos são independentemente conjugados a qualquer proteína carreadora conhecida, por exemplo CRM197, toxóide do tétano, toxóide da difteria, proteína D ou qualquer outras proteínas carreadoras como mencionadas acima.

Opcionalmente, os kits de vacina da invenção compreendem um terceiro componente. Por exemplo, o kit opcionalmente compreende um primeiro recipiente que compreende um ou mais de:

- toxóide do tétano (TT),
- toxóide da difteria (DT), e
- componentes da coqueluche de célula integral ou acelulares

e um segundo recipiente que compreende:

um ou mais conjugados de uma proteína carreadora e um sacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* [onde o sacarídeo capsular é opcionalmente de um sorotipo pneumocócico selecionado do grupo que
5 consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F].

e um terceiro recipiente que compreende:

polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma
10 proteína carreadora, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa, opcionalmente liofilizados.

ou

conjugado de sacarídeo de Hib, e

15 polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa, opcionalmente liofilizados.

20 As composições imunogênicas que compreendem conjugados meningocócicos, por exemplo HibMenC, HibMenAC, HibMenAW, HibMenAY, HibMenCW, HibMenCY, HibMenWY, MenAC, MenAW, MenAY, MenCW, MenCY, MenWY ou MenACWY, incluindo kits de composição similar àquelas descritas acima, opcionalmente compreendem
25 antígenos de sarampo e/ou caxumba e/ou rubéola e/ou varicela. Por exemplo, a composição imunogênica meningocócica contém antígenos do sarampo, caxumba e rubéola ou sarampo, caxumba, rubéola e varicela. Em uma forma de realização, estes antígenos virais estão opcionalmente presentes no mesmo recipiente como o(s) conjugado(s) meningocócico(s) e/ou de sacarídeo de

Hib. Em uma forma de realização, estes antígenos virais são liofilizados.

Um outro aspecto da invenção é um processo para fabricar a composição imunogênica da invenção, que compreende a etapa de misturar polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um, dois ou três dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a uma proteína carreadora com um conjugado de sacarídeo bacteriano, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa.

A preparação de vacina está no geral descrita em Vaccine Design (“The subunit and adjuvant approach” (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nova Iorque). A encapsulação dentro de lipossomas está descrita por Fullerton, Patente US 4.235.877.

Um outro aspecto da invenção é um método de imunizar um hospedeiro humano contra a doença causada pela infecção de *N. meningitidis* e opcionalmente *Haemophilus influenzae* que compreende administrar ao hospedeiro uma dose imunoprotetora da composição imunogênica ou vacina ou kit da invenção.

Um outro aspecto da invenção é uma composição imunogênica da invenção para o uso no tratamento ou prevenção de doença causada pela infecção de *N. meningitidis* e opcionalmente *Haemophilus influenzae*.

Um outro aspecto da invenção é o uso da composição imunogênica ou vacina ou kit da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças causadas pela infecção de *N. meningitidis* e opcionalmente *Haemophilus influenzae*.

Os termos “compreendendo”, “compreendem” e “compreende” aqui são intencionados pelos inventores que sejam opcionalmente substituíveis com os termos “consistindo de”, “consistem de” e “consiste de”, respectivamente, em cada caso.

Todas as referências ou pedidos de patente citados dentro deste

relatório descritivo de patente são aqui incorporados por referência.

A invenção é ilustrada nos exemplos anexos. Os exemplos abaixo são realizados usando técnicas padrão, que são bem conhecidas e rotina para aqueles de habilidade na técnica, exceto onde de outro modo descrito em detalhes. Os exemplos são ilustrativos, mas não limitam a invenção.

Exemplos

Exemplo 1 – Preparação de conjugados de polissacarídeo

A ligação covalente de polissacarídeo PRP de Haemophilus influenzae (Hib) a TT foi realizada por uma química de ligação desenvolvida por Chu et al (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). O polissacarídeo PRP de Hib foi ativado pela adição de CNBr e incubando no pH 10,5 por 6 minutos. O pH foi diminuído ao pH 8,75 e diidrazida do ácido adípico (ADH) foi adicionado e a incubação continuada por mais 90 minutos. O PRP ativado foi ligado ao toxóide do tétano purificado por intermédio da condensação de carbodiimida usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). EDAC foi adicionado ao PRP ativado para atingir uma razão final de 0,6 mg de EDAC/mg de PRP ativado. O pH foi ajustado a 5,0 e toxóide do tétano purificado foi adicionado para atingir 2 mg de TT/mg de PRP ativado. A solução resultante foi deixada por três dias com agitação branda. Depois da filtração através de uma membrana de 0,45 µm, o conjugado foi purificado em uma coluna sefacril S500HR (Pharmacia, Suécia) equilibrada em NaCl 0,2 M.

Os conjugados de MenC–TT foram produzidos usando polissacarídeos nativos (de mais do que 150 kDa como medido por MALLS). Os conjugados MenA-TT foram produzidos usando polissacarídeo nativo ou polissacarídeo levemente microfluidizado de mais do que 60 kDa como medido pelo método MALLS do exemplo 2. Os conjugados MenW e MenY-TT foram produzidos usando polissacarídeos ajustados de cerca de 100 a 200

kDa como medido por MALLS (ver o exemplo 2). A classificação por tamanho foi pela microfluidização usando um aparelho Emulsiflex C-50 homogeneizador. Os polissacarídeos foram depois filtrados através de um filtro de 0,2 μ m.

5 A ativação e ligação foram realizadas como descrito na WO 96/29094 e WO 00/56360. Em resumo, o polissacarídeo a uma concentração de 10 a 20 mg/ml em NaCl 2M pH 5,5 a 6,0 foi misturado com solução de CDAP (100 mg/ml recém preparado em acetonitrila/ WFI, 50/50) a uma razão final de CDAP/polissacarídeo de 0,75/1 ou 1,5/1. Depois de 1,5 minuto, o pH
10 foi elevado com hidróxido de sódio até o pH 10,0. Depois de três minutos o toxóide do tétano foi adicionado para atingir uma razão de proteína/polissacarídeo de 1,5/1 para MenW, 1,2/1 para MenY, 1,5/1 para MenA ou 1,5/1 para MenC. A reação foi continuada por uma a duas horas.

 Depois da etapa de ligação, a glicina foi adicionada a uma
15 razão final de glicina/PS (p/p) de 7,5/1 e o pH foi ajustado ao pH 9,0. A mistura foi deixada por 30 minutos. O conjugado foi clarificado usando um filtro Kleenpak de 10 μ m e foi depois carregado em uma coluna Sephacril S400HR usando um tampão de eluição de 150 mM de NaCl, 10 mM ou 5 mM de Tris pH 7,5. Os lotes clínicos foram filtrados em uma membrana de
20 esterilização Opticap 4. Os conjugados resultantes tiveram uma razão de polissacarídeo:proteína média de 1:1 a 1:5 (p/p).

 De modo a conjugar o polissacarídeo capsular MenA ao toxóide do tétano por intermédio de um espaçador, o seguinte método foi usado. A ligação covalente do polissacarídeo e do espaçador (ADH) é
25 realizada por uma química de ligação pelo que o polissacarídeo é ativado sob condições controladas por um agente de cianilação, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridínio (CDAP). O espaçador reage com o PS cianilado através dos seus grupos hidrazino, para formar uma ligação de isouréia estável entre o espaçador e o polissacarídeo.

Uma solução a 10 mg/ml de MenA foi tratada com uma solução a 100 mg/ml recém preparados de CDAP em acetonitrila/água (50/50 (v/v)) para obter uma razão de CDAP/MenA de 0,75 (p/p). Depois de 1,5 minuto, o pH foi elevado ao pH 10,0. Três minutos mais tarde, ADH foi
 5 adicionado para obter uma razão de ADH/MenA de 8,9. O pH da solução foi diminuído a 8,75 e a reação prosseguiu por 2 horas.

Antes da reação de conjugação, a solução de TT purificada e a solução de PSA_{AH} foram diluídas para atingir uma concentração de 10 mg/ml para PSA_{AH} e 10 mg/ml para TT. EDAC foi adicionado à solução de PSA_{AH} de
 10 modo a atingir uma razão final de 0,9 mg de EDAC/mg de PSA_{AH}. O pH foi ajustado a 5,0. O toxóide do tétano purificado foi adicionado com uma bomba peristáltica (em 60 minutos) para atingir 2 mg de TT/mg de PSA_{AH}. A solução resultante foi deixada 60 min a +25° C sob agitação para obter um tempo de ligação final de 120 min. O conjugado foi clarificado usando um filtro de 10
 15 µm e foi purificado usando uma coluna Sephacril S400HR.

Exemplo 2 – Determinação de peso molecular usando MALLS

Detectores foram ligados a uma coluna de HPLC por exclusão de tamanho a partir da qual as amostras foram eluídas. Por um lado, o detector de dispersão de luz de laser mediu as intensidades de luz dispersadas em
 20 ângulos de 16 pela solução macromolecular e por outro lado, um refratômetro interferométrico colocado on-line permitiu a determinação da quantidade de amostras eluídas. A partir destas intensidades, o tamanho e a forma das macromoléculas em solução puderam ser determinados.

O peso molecular médio ponderado (M_w) é definido como a
 25 soma dos pesos de todas as espécies multiplicado pelo seu respectivo peso molecular e dividido pela soma dos pesos de todas as espécies.

a)Peso molecular médio ponderado: -M_w-

$$M_w = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

b) Peso molecular médio numérico: -Mn-

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

c) Raio da média quadrada: -Rw- e R^2w é o raio quadrado definido por:

$$R^2w \text{ ou } (r^2)w = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i}$$

(-m_i- é a massa de um centro de dispersão i e -n- é a distância entre o centro de dispersão i e o centro de gravidade da macromolécula).

d) A polidispersividade é definida como a razão -Mw / Mn-.

5 Os polissacarídeos meningocócicos foram analisados por MALLS carregando-se em duas colunas de HPLC (TSKG6000 e 5000PWx1) usados em combinação. 25 µl do polissacarídeo foram carregados na coluna e foram eluídos com 0,75 ml de água filtrada. Os polissacarídeos são detectados usando um detector de dispersão de luz (Wyatt Dawn DSP equipado com um
10 laser de argônio de 10 mW a 488 nm) e um refratômetro interferométrico (Wyatt Otilab DSP equipado com uma célula P100 e um filtro vermelho a 498 nm).

As polidispersividades de peso molecular e as recuperações de todas as amostras foram calculadas pelo método de Debye usando uma ordem de ajuste polinomial de 1 no software Astra 4.72.

15 Exemplo 3 – Teste clínico comparando a imunização com Meningitec ou um conjugado de MenC-TT ajustado grande

Um estudo de fase II, aberto, controlado foi realizada para comparar a vacina de conjugado meningocócico do sorogrupo C (MenC) da GSK Biologicals com a vacina conjugada de Haemophilus influenzae b-meningocócico sorogrupo C (Hib-MenC) ou Meningitec®. Cada dose de
20 Meningitec® contém 10 µg de conjugado de oligossacarídeos meningocócicos sorogrupo C para 15 µg de CRM197 e é produzido pela Wyeth. O conjugado GSK de MenCs conteve polissacarídeos nativos de cerca de 200 kDa

conjugados ao toxóide do tétano (TT).

O estudo consistiu de cinco grupos, cada um planejado para conter 100 pacientes, alocados em dois ramos paralelos como segue:

Neste presente estudo, todos os pacientes em ambos os ramos receberam um quinto (1/5) de uma dose de Mencevax[®] ACWY e uma dose concomitante de Infanrix[®] hexa dos 12 aos 15 meses de idade (Mês de estudo 0). Duas amostras de sangue foram coletadas de todos os pacientes (Mês de estudo 0 e Mês de estudo 1). O ramo 1 consistiu de quatro grupos de um estudo de vacinação primário que foram iniciados na idade de 3, 4 e 5 meses com as seguintes vacinas:

- Grupo K: MenC (10 µg), não adsorvido sobre sais de alumínio (não-ads), toxóide do tétano (TT) conjugado e Infanrix[®] hexa (MenC10-TT + Infanrix[®] hexa)

- Grupo L: Hib (10 µg)-MenC (10 µg), TT não-ads conjugado e Infanrix[®] penta (Hib10-MenC10-TT + Infanrix[®] penta)

- Grupo M: Hib (5 µg)-MenC (5 µg), non-ads, TT conjugado e Infanrix[®] penta (Hib5-MenC5-TT + Infanrix[®] penta)

- Grupo N: Meningitec[®] e Infanrix[®] hexa (Meningitec[®] + Infanrix[®] hexa)

Os dois grupos de vacina Hib-MenC-TT (Grupos L e M) foram mantidos cegos no estudo de reforço como para a formulação exata da vacina candidata.

Ramo 2 - (Grupo O) consistiu de pacientes igualados em idade não previamente vacinados com uma vacina meningocócica sorogrupo C (ingênuo) mas que recebeu vacinas pediátricas de rotina de acordo com a German Permanent Commission on Immunization.

Critérios para avaliação:

Imunogenicidade. Determinação de títulos de anticorpos bactericidas contra meningocócico C (SBA-MenC) por um teste bactericida

(corte: uma diluição de 1:8) e medições de ELISA de anticorpos contra sorogrupo C meningocócico (corte de ensaio: 0,3 µg/ml), o polissacarídeo PRP de Hib (corte de ensaio: 0,15 µg/ml) e o toxóide do tétano (corte de ensaio: 0,1 IU/ml) em amostras de sangue obtidas antes da vacinação e

5 aproximadamente um mês depois da vacinação em todos os pacientes.

Métodos estatísticos:

Demográficos: Determinação da idade média em meses (com média, faixa e desvio padrão [SD]), e composição racial e de gênero dos grupos vacinados com ATP e Total.

10 Imunogenicidade:

Duas análises de imunogenicidade foram realizadas com base no grupo de ATP quanto a imunogenicidade (para as análises da memória imune e resposta de reforço) ou o grupo de ATP quanto à segurança (para a análise de persistência). Estes incluíram:

15 Avaliação da memória imune para MenC e resposta de reforço para Hib e Tétano (antes e um mês depois da administração de 1/5 da dose da vacina de polissacarídeo simples):

- Determinação dos títulos e concentrações médios geométricos (GMTs e GMCs) com 95 % de intervalos de confiança (95 %

20 de CI)

- Determinação da porcentagem de pacientes com título/concentração de anticorpo acima dos cortes propostos com 95 % de CI exatos (taxas de soropositividade/soroproteção)

- Investigação de títulos/concentração de anticorpo depois da

25 vacinação usando curvas acumulativas reversas

- Computação dos 95 % de CI assintóticos padronizados para a diferença na razão de soropositividade/soroproteção

- entre o grupo inicial (Grupos K, L, M e N) e o grupo não inicial (Grupo O)

- Determinação da média geométrica da razão individual do título de SBA-MenC em relação à concentração anti-PSC, com 95 % de CI

- Determinação dos 95 % de CI para a razão de GMT/C após a vacinação entre os grupos K, L, M e o grupo de controle N quanto ao anti-PRP e anti-tétano e entre cada grupo iniciado (Grupos K, L, M e N) e o grupo não iniciado (Grupo O) para SBA-MenC e anti-PSC usando um modelo de ANOVA

Resultados

Tabela 1. Títulos de SBA-MenC e concentração de anticorpo

10 anti-PSC depois da vacinação de reforço

Anticorpo	Grupo	N	GMT/C	95 % de CL LL	95 % de CL UL
SBA-MenC	K - MenC-TT	71	3508,9	2580,1	4772,2
	L - HibMenC	79	2530,1	1831,7	3494,7
	M - HibMenC	81	5385,4	4425,0	6554,2
	N - Meningitec	85	1552,6	1044,4	2307,9
	O - Controle	91	9,3	6,3	13,6
Anti-PSC	K - MenC-TT	70	28,10	22,59	34,95
	L - HibMenC	71	30,01	24,09	37,38
	M - HibMenC	76	34,58	29,10	41,09
	N - Meningitec	78	16,59	12,98	21,21
	O - Controle	94	3,05	2,36	3,93

Grupo K: pacientes iniciados com MenC10-TT + Infanrix. hexa; Grupo L: pacientes iniciados com Hib10-MenC10-TT + Infanrix. penta; Grupo M: pacientes iniciados com Hib5-MenC5-TT + Infanrix. penta; Grupo N: pacientes iniciados com Meningitec. + Infanrix. hexa; Grupo O: pacientes de controle (isto é, pacientes não iniciados com vacina de conjugado de MenC)

N: número de pacientes com resultados disponíveis

Os títulos mais altos de anticorpos contra MenC e títulos de SBA mais altos foram obtidos iniciando-se com as vacinas conjugadas de polissacarídeo MenC ajustado maior (grupos K, L e M) comparadas com a vacina de conjugado de oligossacarídeo Meningitec.

Tabela 2: Razão da média geométrica para o título de SBA MenC/ concentração de anti-PSC

Grupo	Controle do tempo	N	GMR	LL	UL
K	Pré	70	49,470	34,939	70,044
	Pós	66	126,138	101,419	156,882
L	Pré	76	36,528	25,849	51,621
	Pós	70	90,200	70,153	115,975
M	Pré	77	51,298	36,478	72,139
	Pós	74	164,950	139,304	195,318
N	Pré	84	22,571	16,521	30,837
	Pós	76	90,168	67,757	119,991
O	Pré	3	91,634	0,651	12889,8
	Pós	87	2,708	1,767	4,149

Em todos os quatro grupos iniciados (Grupos K, L, M e N), a GMR aumentou significativamente da pré para a pós vacinação de reforço indicando a presença de maturação e funcionalidade de anticorpo. GMR no Grupo M (iniciados com Hib5-MenC5-TT) foi mais alta do que no Grupo N (iniciados com Meningitec[®]).

Tabela 3: Persistência em 12 a 15 meses de idade exatamente

antes da administração das vacinas de reforço

Pontos finais	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferença	Valor %
SBAMenC ≥ 1:8	K	79	88,6	N	91	80,2	N-K	-8,4
	L	84	93,3	N	91	80,2	N-L	-3,1
	M	85	87,1	N	91	80,2	N-M	-6,8
SBAMenC ≥ 1:128	K	79	65,8	N	91	51,6	N-K	-14,2
	L	84	56,0	N	91	51,6	N-L	-4,3
	M	85	64,7	N	91	51,6	N-M	-13,1
Anti-PSC ≥ 0,3 µg/ml	K	79	100,0	N	91	100,0	N-K	0,0
	L	84	100,0	N	91	100,0	N-L	0,0
	M	88	98,9	N	91	100,0	N-M	1,1
Anti-PSC ≥ 2 µg/ml	K	79	72,2	N	91	81,3	N-K	9,2
	L	84	64,3	N	91	81,3	N-L	17,0
	M	88	64,3	N	91	81,3	N-M	8,6
Anti-PRP ≥ 0,15 µg/ml	K	81	88,9	N	91	85,7	N-K	-3,2
	L	86	96,5	N	91	85,7	N-L	-10,8
	M	90	98,9	N	91	85,7	N-M	-13,2
Anti-PRP ≥ 1 µg/ml	K	81	33,3	N	91	28,6	N-K	-4,8
	L	86	55,8	N	91	28,6	N-L	-27,2
	M	90	74,4	N	91	28,6	N-M	-45,9
Anti-tétano ≥ 0,1 IU/ml	K	81	100,0	N	91	96,7	N-K	-3,3
	L	86	100,0	N	91	96,7	N-L	-3,3
	M	90	100,0	N	91	96,7	N-M	-3,3

Grupo K: pacientes iniciados com MenC10-TT + Infanrix. hexa; Grupo L: pacientes iniciados com Hib10-MenC10-TT + Infanrix. penta; Grupo M: pacientes iniciados com Hib5-MenC5-TT + Infanrix. penta; Grupo N: pacientes iniciados com Meningitec. + Infanrix. hexa; N: número de

pacientes com resultados disponíveis

Os títulos de SBA mais altos contra MenC foram obtidos iniciando-se com o tamanho maior de MenC (grupos K, L e M) comparado a iniciação com o conjugado de MenC-oligossacarídeo Meningitec.

5 Memória imune (corte ATP para imunogenicidade)

A administração de 1/5 da dose da vacina ACWY de polissacarídeo simples evocou título de SBA-MenC muito alto em todos os quatro grupos iniciados com 98,7 a 100 % e 97,5 a 100 % de pacientes iniciados com um regime de vacina candidata que exhibe títulos de 1:8 e 1:128, respectivamente. Nos grupos iniciados com o regime Meningitec[®], houve uma tendência para uma porcentagem mais baixa de pacientes com títulos 1:128 (91,8 %). Em comparação, 17,6 % dos pacientes não iniciados tiveram títulos de SBA MenC de 1:8 e 1:128.

15 Exemplo 4: Teste clínico de Fase II em vacina conjugada de HibMenAC -TT misturada com DTPw-HepB

Planejamento do Estudo: Aberto, randomizado (1:1:1:1:1), estudo de centre único com cinco grupos.

Os cinco grupos receberam os seguintes regimes de vacinação respectivamente, em 6, 10 e 14 semanas de idade.

20 • Tritanrix-HepB/Hib-MenAC 2,5 µg/2,5 µg/2,5 µg: de agora em diante aludido como 2,5/2,5/2,5

• Tritanrix-HepB/Hib-MenAC 2,5 µg/5 µg/5 µg: de agora em diante aludido como 2,5/5/5

25 • Tritanrix-HepB/Hib-MenAC 5 µg/5 µg/5 µg: de agora em diante aludido como 5/5/5

• Tritanrix-HepB + Hiberix: de agora em diante aludido como Hiberix

• Tritanrix-HepB/Hiberix + Meningitec: de agora em diante aludido como Meningitec

As amostras de sangue foram coletadas no momento da primeira dose de vacina (Pré) e um mês depois da terceira dose de vacina (Pós-dose 3).

5 Tritanrix é uma vacina DTPw comercializada pela GlaxoSmithKline Biologicals S.A.

105 pacientes foram usados em cada um dos cinco grupos dando um total de 525 pacientes no estudo.

Tabela 4 Conteúdo das formulações de vacina GSK

Componentes por dose (0,5 ml)	2,5/2,5/2,5*	2,5/5/5	5/5/5
Polissacarídeo capsular PRP de Hib conjugado ao toxóide do tétano (TT)	2,5 µg	2,5 µg	41 µg
Polissacarídeo capsular de <i>Neisseria meningitidis</i> A (PSA) conjugado a TT	2,5 µg	5 µg	5 µg
Polissacarídeo capsular de <i>Neisseria meningitidis</i> C (PSC) conjugado a TT	2,5 µg	5 µg	5 µg

* A vacina 2,5/2,5/2,5 foi uma diluição de dose da vacina Hib-MenAC 5/5/5 da GSK Biologicals contendo 2,5 µg de cada um de PRP-TT, MenA-TT e MenC-TT.

10 As formulações de vacina Hib-MenAC foram misturadas extemporaneamente com Tritanrix-HepB da GSK Biologicals combinada com a vacina da difteria-tétano-célula integral de Bordetella pertussis – hepatite B (DTPw-HB) (Tritanrix-HepB) contêm não menos do que 30 Unidades Internacionais (IU) do toxóide da difteria, não menos do que 60 IU de toxóide do tétano, não menos do que 4 IU de Bordetella pertussis morta e
15 10 µg de antígeno de superfície da hepatite B recombinante.

Terapia de referência, dose, modo de administração, lote N^o:

Programa/sítio de vacinação: Um grupo recebeu a vacina Tritanrix.-HepB intramuscularmente na coxa esquerda e Hiberix[®] intramuscularmente na coxa direita em 6, 10 e 14 semanas de idade. Um outro
20 grupo recebeu a vacina Tritanrix[®]-HepB/Hiberix[®] intramuscularmente na coxa esquerda e vacina Meningitec intramuscularmente na coxa direita em 6, 10 e 14 semanas de idade.

Vacina/composição/dose/número do lote: A vacina Tritanrix[®]-HepB usada foi como descrita acima.

25 Uma dose (0,5 ml) de vacina conjugada de Haemophilus

influenzae tipo b da GSK Biologicals: Hiberix[®] contve 10 µg de conjugados de PRP ao toxóide do tétano. No Grupo Hiberix[®], esta foi misturada com diluente estéril e no Grupo Meningitec[®] a mesma foi misturada com Tritanrix[®]-HepB.

- 5 Uma dose (0,5 ml) de vacina MENINGITEC[®] da Wyeth Lederle contve: 10 µg de oligossacarídeo capsular do grupo C meningocócico conjugados a 15 µg de proteína CRM197 da Corynebacterium diphtheria e alumínio como sais.

Resultados - Resposta imunes geradas contra Hib, MenA e

10 MenC

Tabela 5a Anti - PRP (Actml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix TM			Meningitec TM		
	%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
%≥0.15	100	96,5	100	99,0	94,8	100	100	96,5	100	100	96,5	100	100	96,5	100
GMC	20,80	15,96	27,10	22,62	17,72	28,88	19,36	15,33	24,46	38,55	29,33	49,64	10,94	8,62	13,88

Tabela 5b SBA –MenC

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix TM			Meningitec TM		
	%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
%≥1:8	99	94,7	100	100	96,5	100	100	96,5	100	2,9	0,6	8,4	100	96,5	100
GMT	3132	2497	3930	4206	3409	5189	3697	3118	4384	4,7	3,9	5,6	4501	3904	5180

Tabela 5c SBA MenA

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix TM			Meningitec TM		
	%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
%≥1:8	99,7	91,9	99,7	100	95,8	100	100	96,2	100	6,8	2,5	14,3	9,1	4,0	17,1
GMT	316,7	251,4	398,9	418,5	358,6	488,5	363	310,5	424,4	5,6	4,3	7,4	5,6	4,4	7,2

Tabela 5d - Anti-PSC (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix TM			Meningitec TM		
	%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
%≥0.3	100	96,5	100	100	96,4	100	100	96,5	100	8,2	3,6	15,6	100	96,5	100
GMC	49,03	43,24	55,59	71,11	62,49	80,92	61,62	54,88	69,20	0,17	0,15	0,19	58,02	51,42	65,46

15 Tabela 5e Anti - PSA (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix TM			Meningitec TM		
	%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
%≥0.3	100	96,4	100	100	96,5	100	99,0	94,8	100	1,0	0,0	5,4	5,9	2,2	12,5
GMC	18,10	15,34	21,35	26,51	22,93	30,79	23,40	20,05	27,30	0,15	0,15	0,15	0,17	0,15	0,18

Conclusão

Uma comparação dos resultados de imunogenicidade obtidos usando a vacina de conjugado oligossacarídico de MenC-CRM197 e as três formulações GSK que contêm os conjugados polissacarídicos MenA-TT e MenC-TT mostraram que os conjugados polissacarídicos Men foram capazes

de evocar uma boa resposta imunogênica similar àquela obtida usando a vacina de conjugado de oligossacarídeo Meningitec. Todas as formulações testadas deram uma resposta a MenC em 100 % dos pacientes.

Exemplo 5 - Teste clínico de Fase II administrando Hib

5 MenCY concomitantemente com Infanrix penta de acordo com um programa de 2, 3 e 4 meses

Planejamento do Estudo: Um estudo de Fase II, aberto (parcialmente duplo cego*) randomizado de centro múltiplo controlado com 5 grupos recebendo um programa primário de três doses com vacinas como segue:

Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix[®] penta

Grupo Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix[®] penta

15 Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix[®] penta

Grupo Hib-MenC: Hib-MenC (5/5) + Infanrix[®] penta

Grupo Menjugate: Menjugate^{®**} + Infanrix[®] hexa (controle).

*Hib-MenCY 2,5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 e Hib-MenC foram administrados em uma maneira duplo cego enquanto que o grupo Hib-MenCY 5/5/5 e o grupo Menjugate foram abertos. As formulações 2,5/5/5, 5/10/10 e 5/5/5 de Hib-MenCY contiveram os polissacarídeos nativos MenC e os polissacarídeos que são microfluidizados MenY.

25 **Menjugate[®] contém 10 µg de oligossacarídeos conjugados MenC para 12,5 a 25 µg de CRM197 por dose e é produzido pela Chiron.

A vacinação em +/- 2, 3, 4 meses de idade (Mês de estudo 0, Mês 1 e Mês 2), e as amostras de sangue (3,5 ml) de todos os pacientes antes da vacinação primária e um mês após a mesma (Mês de estudo 0 e Mês 3).

Vacina de estudo, dose, modo de administração, número do

lote: Três doses injetadas intramuscularmente em intervalos de um mês, em aproximadamente 2, 3 e 4 meses de idade como segue:

Tabela 6: Vacinas administradas (estudo e controle), grupo, programa/sítio e dose

Grupo	Programa (Meses de Idade)	Dose de Vacina Administrada Local Coxa esquerda Superior	Vacina concomitante Administrada Local Coxa Direita Superior
Hib-MenCY 2,5/5/5	2, 3, e 4	Hib (2,5µg)- MenC-TT (5µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix TM penta)
Hib-MenCY 5/10/10	2, 3, e 4	Hib (5µg)-MenC-TT 10µg)-MenY-TT (10 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix TM penta)
Hib-MenCY 5/5/5	2, 3, e 4	Hib (5µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix TM penta)
Hib-MenC	2, 3, e 4	Hib (5µg)-Men C (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix TM penta)
Menjugate TM	2, 3, e 4	Menjugate TM	DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix TM hexa)

5 Imunogenicidade: Medição de títulos/concentrações de anticorpo contra cada antígeno de vacina:

Antes da primeira dose (Mês 0) e aproximadamente um mês depois da terceira dose (Mês 3) em todos os pacientes para: SBA-MenC e SBA-MenY, anti-PSC e anti-PSY, anti-PRP, anti-T, anti-FHA, anti-PRN e
10 anti-PT. Usando a atividade bactericida sérica contra os sorogrupos C e Y de *N. meningitidis* (corte de SBA-MenC e SBA-MenY: 1:8 e 1:128); Ensaio de ELISA com cortes: $\geq 0,3$ mg/ml e ≥ 2 µg/ml para os polissacarídeos de sorogrupos C e Y anti- *N. meningitidis* (IgG anti-PSC e IgG anti-PSY); $\geq 0,15$ µg/ml e $\geq 1,0$ µg/ml para o polissacarídeo de Hib polirribosil-ribitol-fosfato
15 (IgG anti-PRP); 5 EL.U/ml para anti-FHA, anti-PRN, anti-PT; $\geq 0,1$ IU/ml de anti-toxóide do tétano (anti-TT"). Apenas em um mês depois da terceira dose (Mês 3) em todos os pacientes para: anti-D, anti-HBs e anti-polio 1, 2 e 3. Usando ensaios de ELISA com cortes: $\geq 0,1$ IU/ml para anti-difteria (anti-D); ≥ 10 mIU/ml para anti-hepatite B (anti-HBs); e corte de teste de
20 microneutralização: 1:8 para anti-polio tipo 1, 2 e 3 (anti-polio 1, 2 e 3).

Métodos estatísticos:

As taxas de soroproteção/soropositividade e as

concentrações/títulos médios geométricos (GMCs/GMTs) com 95 % de intervalos de confiança (95 % de CI) foram computados por grupo, para SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY, anti-PRP, anti-Tetano, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN antes da vacinação e um mês depois da mesma; para anti-Difteria, anti-HBs, anti-Polio 1, anti-Polio 2 e anti-Polio 3 um mês depois da vacinação. A resposta de vacina (aparência de anticorpos em pacientes inicialmente soronegativos ou pelo menos manutenção das concentrações de anticorpo em pacientes inicialmente soropositivos) com 95 % de CI para anti-PT, anti-PRN e anti-FHA também foram computadas um mês depois da vacinação. As Curvas acumulativas reversas para cada anticorpo no Mês 3 também são apresentadas. As diferenças entre os grupos Hib-MenCY e os grupos Hib-MenC, comparado com o grupo de controle Menjugate[®] foram avaliados em uma maneira exploratória para cada anticorpo, exceto para SBA-MenY e anti-PSY, em termos (1) da diferença entre o grupo Menjugate[®] grupo (negativo) os grupos Hib-MenCY e Hib-MenC quanto a porcentagem de pacientes acima dos cortes especificados ou com uma resposta de vacina com seus 95 % de CI padronizados assintóticos, (2) as taxas de GMC ou GMT do grupo Menjugate[®] nos grupos Hib-MenCY e Hib-MenC com seus 95 % de CI. As mesmas comparações foram feitas para avaliar a diferença entre cada par de formulações Hib-MenCY para anticorpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY e anti-TT.

Taxas de soroproteção/soropositividade & GMC/Ts (grupo ATP para imunogenicidade)

Tabela 7a Anti - PRP (µg/ml)

Grupo	N	% ≥ 0,15	LL	UL	≥ 1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,01	7,25	11,21
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,49	7,72	11,65
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	98,6	92,3	100,0	8,08	6,53	9,98
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	98,6	92,7	100,0	10,44	8,49	12,83
Menjugate TM	71	100,0	94,9	100,0	80,3	69,1	88,8	2,60	1,97	3,43

Tabela 7b SBA - MenC (título)

Grupo	N	% ≥ 1:8	LL	UL	≥ 1:128	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	95,7	88,0	99,1	1005,8	773,5	1308,0
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	94,0	85,4	98,3	1029,8	799,7	1326,0

Hib MenCY 5/5/5	71	100,0	94,9	100,0	94,4	86,2	98,4	906,9	691,3	1189,8
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	95,9	88,6	99,2	871,0	677,3	1120,0
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	3557,6	2978,8	4248,8

Tabela 7c Anti-PSC (µg/ml)

Grupo	N	%≥ 0,3	LL	UL	≥2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	21,70	18,36	25,65
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	27,26	23,26	31,95
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	19,02	16,49	21,93
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	100,0	95,1	100,0	21,08	18,24	24,35
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	38,49	33,64	44,05

Tabela 7d SBA-MenY (Título)

Grupo	N	%≥ 1:8	LL	UL	≥1:128	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	69	97,1	89,9	99,6	92,8	83,9	97,6	470,7	351,1	631,2
Hib MenCY 5/10/10	66	97,0	89,5	99,6	86,4	75,7	93,6	437,1	322,0	593,4,8
Hib MenCY 5/5/5	71	98,6	92,4	100,0	95,8	88,1	99,1	635,3	501,5	804,8
Hib MenC	74	21,6	12,9	32,7	13,5	6,7	23,5	9,3	6,3	13,7
Menjugate™	71	19,7	11,2	30,9	9,9	4,1	19,3	7,5	5,4	10,4

Tabela 7e Anti - PSY (µg/ml)

Grupo	N	%≥ 0,3	LL	UL	≥ 2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	26,86	22,86	31,56
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	37,02	31,84	43,04
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	23,57	19,94	27,86
Hib MenC	74	8,1	3,0	16,8	4,1	0,8	11,4	0,19	0,15	0,25
Menjugate™	71	5,6	1,6	13,8	1,4	0,0	7,6	0,17	0,15	0,19

Tabela 7f Anti-tétano (IU/ml)

Grupo	N	%≥ 0,1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	68	100,0	94,7	100,0	3,06	2,63	3,55
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	3,25	2,88	3,68
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	2,97	2,59	3,41
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	3,15	2,73	3,64
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	1,66	1,39	1,97

- 5 **(Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix® penta**
Grupo Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix® penta
Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix® penta
Grupo Hib-MenC: Hib-Men (5/5) + Infanrix® hexa
Grupo Menjugate: Menjugate® + Infanrix® penta

10 N = número de pacientes com resultados disponíveis. % = porcentagem de pacientes com concentração/título dentro da faixa especificada

GMCfr: concentração/título média geométrica 95 % de CI = 95 % intervalo de confiança; LL = Limite Inferior; UL = Limite Superior

Conclusão

Os conjugados de polissacarídeo MenC e Y produziram uma boa resposta imune em todos os pacientes com 100 % de pacientes produzindo acima de 0,3 µg/ml de respostas contra MenC e MenY.

5 Exemplo 6 – Teste clínico de Fase II comparando três formulações de MenACWY-TT com vacina de oligossacarídeo-conjugado Meningitec MenC-CRM197.

10 Este exemplo relata um estudo de fase II, aberto (parcialmente cego), randomizado, dose-faixa controlada para avaliar a imunogenicidade de três formulações diferentes de vacina dos sorogrupos meningocócicos A, C, W-135, Y toxóide do tétano conjugado (MenACWY-TT) da GlaxoSmithKline Biological em comparação com uma vacina conjugada de oligossacarídeo MenC-CRM197 (Meningitec) quando dada como uma dose para crianças de 12 a 14 meses de idade.

15 O teste clínico foi um estudo aberto (parcialmente duplo cego*), controlado, multicêntrico em que pacientes elegíveis de 12 a 14 meses foram randomizados (1:1:1:1) a um de quatro grupos em paralelo de 50 pacientes para receber uma única dose primária na Visita 1 como segue:

20 Forma 1T: MenACWY-TT em uma dose de 2,5 mg de conjugado de polissacarídeo MenAs para toxóide do tétano (TT), 2,5 µg de conjugado de polissacarídeo MenCs para TT, 2,5 µg de conjugados de polissacarídeo MenW para TT e 2,5 µg de conjugados de polissacarídeo MenY para TT.

25 Forma 2T: MenACWY-TT em uma dose de 5 µg de conjugados de polissacarídeo MenA para TT, 5 µg de conjugados de polissacarídeo MenC para TT, 5 µg de conjugados de polissacarídeo MenW para TT e 5 µg de conjugados de polissacarídeo MenY para TT.

Forma 3T: MenACWY-TT em uma dose de 2,5 µg de conjugados de polissacarídeo MenA para TT, 10 µg de conjugados de

polissacarídeo MenC para TT, 2,5 µg de conjugados de polissacarídeo MenW para TT e 2,5 µg de conjugados de polissacarídeo MenY para TT.

Ctrl T: conjugados de oligossacarídeo MenC para 12,5 a 25 µg de CRM197 (Meningitec[®]).

5 *As três formulações de MenACWY-TT diferentes foram administradas em uma maneira duplo cego.

Programa/sítio de vacinação: Uma dose de vacina única foi administrada intramuscularmente no deltóide esquerdo na Visita 1 (Mês de estudo 0) de acordo com designação randomizada. Todas as vacinas candidatas foram fornecidas como uma pelota liofilizada em um frasco de monodose (0,5 ml depois da reconstituição com o diluente de solução salina fornecido).

Imunogenicidade: Medição de títulos/concentrações de anticorpos contra componentes antigênicos em vacina meningocócica em amostras de sangue obtidas antes da dose de vacina do estudo (Mês 0) e aproximadamente um mês depois da dose de vacina do estudo (Mês 1) em todos os pacientes. A determinação de títulos de anticorpo bactericida contra os sorogrupos de *N. meningitidis* A, C, W-135 e Y (SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW e SBA-MenY) por um teste bactericida (cortes de ensaio: uma diluição de 1:8 e 1:128) e medições de ELISA de anticorpos contra sorogrupos de *N. meningitidis* A, C, W-135 e Y (anti-PSA, anti-PSC, anti-PSW e anti-PSY, cortes de ensaio $\geq 0,3$ µg/ml e ≥ 2 µg/ml), e toxóide do tétano (anti-tétano, corte de ensaio $\geq 0,1$ IU/ml).

Resultados

25 As respostas de anticorpo em termos da porcentagem de respondedores de SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW e SBA-MenY um mês depois da vacinação (o ponto final primário) é mostrado na Tabela 8. Uma resposta é definida como maior do que ou igual a um aumento de 4 vezes para pacientes soropositivos ou soroconversão para pacientes

soronegativos antes da vacinação.

Tabela 8: Respostas de Vacina para anticorpo SBA um mês depois da vacinação

Anticorpo	Grupo	N	%	LL	UL
SBA-MenA	Forma 1T	42	61,9	45,6	76,4
	Forma 2T	39	82,1	66,5	92,5
	Forma 3T	40	62,5	45,8	77,3
	Meningitec®	36	11,1	3,1	26,1
SBA-MenC	Forma 1T	46	97,8	88,5	99,9
	Forma 2T	43	100,0	91,8	100,0
	Forma 3T	44	95,5	84,5	99,4
	Meningitec®	49	91,8	80,4	97,7
SBA-MenW	Forma 1T	45	100,0	92,1	100,0
	Forma 2T	43	97,7	87,7	99,9
	Forma 3T	45	100,0	92,1	100,0
	Meningitec®	46	15,2	6,3	28,9
SBA-MenY	Forma 1T	47	97,9	88,7	99,9
	Forma 2T	44	88,6	75,4	96,2
	Forma 3T	45	93,3	81,7	98,6
	Meningitec®	49	4,1	0,5	14,0

A Tabela 9 mostra os números de pacientes que obtêm os títulos de SBA nos pontos de corte de 1:8 e 1:128 assim como GMTs.

Tabela 9: Taxas de Soropositividade e GMTs para anticorpos SBA um mês depois da vacinação

	Grupo	N	%	≥ 1:8 LL	UL	%	≥ 1:128 LL	UL	GMT
SBA-MenA	Forma 1T	46	100	92,3	100	100	92,3	100	1457,3
	Forma 2T	45	100	92,1	100	97,8	88,2	99,9	1776,9
	Forma 3T	48	97,9	88,9	99,9	97,9	88,9	99,9	1339,5
	Meningitec®	41	51,2	35,1	67,1	43,9	28,5	60,3	42,8
SBA-MenC	Forma 1T	47	97,9	88,7	99,9	78,7	64,3	89,3	281,3
	Forma 2T	45	100	92,1	100	84,4	70,5	93,5	428,6
	Forma 3T	47	95,7	85,5	99,5	85,1	71,7	93,8	478,4
	Meningitec®	50	94,0	83,5	98,7	62,0	47,2	75,3	200,1
SBA-MenW	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	2529,1
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	2501,6
	Forma 3T	48	100	92,6	100	97,9	88,9	99,9	2300,2
	Meningitec®	48	27,1	15,3	41,8	6,3	1,3	17,2	9,4
SBA-MenY	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	1987,4
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	2464,8
	Forma 3T	48	100	92,6	100	97,9	88,9	99,9	2033,7
	Meningitec®	49	49,0	34,4	63,7	28,6	16,6	43,3	25,0

A vacinação com todas as três formulações do conjugado de polissacarídeo ACWY-TT levou a boas respostas de SBA contra MenA, MenC, MenW e MenY com 95 a 100 % dos pacientes com títulos maiores do que 1:8. Em particular, as formulações 5/5/5/5 e 2,5/10/2,5/2,5 dos conjugados de polissacarídeo produzidos uma resposta mais alta contra MenC do que a vacina Meningitic oligossacarídica como observado por uma proporção mais alta de pacientes tendo um título maior do que 1:128 e as leituras de GMT.

Tabela 10 Taxas de soropositividade e GMCs para anticorpos anti polissacarídicos um mês depois da vacinação

	Grupo	N	%	$\geq 0,3$ $\mu\text{g/ml}$ LL	UL	%	$\geq 2 \mu\text{g/ml}$ $\mu\text{g/ml}$ LL	UL	GMC $\mu\text{g/ml}$
Anti-MenA	Forma 1T	47	93,6	82,5	98,7	68,1	52,9	80,9	2,35
	Forma 2T	45	100	92,1	100	64,4	48,8	78,1	3,11
	Forma 3T	48	95,8	85,7	99,5	37,5	24,0	52,6	1,65
	Meningitec®	50	10,0	3,3	21,8	2,0	0,1	10,6	0,18
Anti-MenC	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	9,57
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,53
	Forma 3T	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	19,29
	Meningitec®	49	98,0	89,1	99,9	93,9	83,1	98,7	7,95
Anti-MenW	Forma 1T	47	100	92,5	100	80,9	66,7	90,9	4,56
	Forma 2T	45	100	92,1	100	93,3	81,7	98,6	6,83
	Forma 3T	48	93,8	82,8	98,7	72,9	58,2	84,7	2,88
	Meningitec®	50	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	7,1	0,15
Anti-MenY	Forma 1T	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	8,90
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,78
	Forma 3T	47	97,9	88,7	99,9	87,2	74,3	95,2	5,67
	Meningitec®	50	2,0	0,1	10,6	0,0	0,0	7,1	0,15

Todas as três formulações da vacina de conjugado de polissacarídeo ACWY-TT produziram boas respostas imunes contra MenA, MenC, MenW e MenY entre 93 % e 100 % dos pacientes obtendo títulos maiores do que 0,3 $\mu\text{g/ml}$. as leituras de GMC mais altas foram obtidos usando as formulações 5/5/5/5 e 2/5/10/2,5/2,5 da vacina de conjugados de polissacarídeo ACWY-TT em comparação com Meningitec®.

Exemplo 7 - Comparação da imunogenicidade de conjugados polissacarídicos de MenY nativo e ajustado

Camundongos (fêmeas DBA/2 de 6 a 8 semanas) receberam duas injeções, 2 semanas separadamente, de PSY-TT pela via subcutânea. As amostras de sangue foram tiradas 14 dias depois da segunda injeção de modo a realizar ELISA e SBA anti-PSY usando a cepa S1975 menY. Por injeção, os camundongos receberam 1 μg de PSY-TT (formulação lio não ajust).

Os conjugados descritos na tabela 11 foram usados.

Tabela 11

Conjugados	ENYTT012	ENYTT014	ENYTT015 bis
Microfluidização PSY	Não	Sim (40 ciclos)	Sim (20 ciclos)
Razão TT/PS	1/1	1/1	1/1

Resultados

Os resultados (Figura 1) mostram uma tendência voltada para a imunogenicidade mais alta para os conjugados preparados usando PSY

ajustado. A Figura 1A mostra que os resultados de GMC obtidos em um ELISA para anti-soros incitaram contra os conjugados preparados a partir de MenY nativo (ENYTT012),

MenY microfluidizado – 40 ciclos (ENYTT014) e MenY
5 microfluidizado – 20 ciclos (ENYTT015 bis). GMCs mais altos foram obtidos onde o MenY-TT foi preparado a partir de MenY microfluidizado.

Resultados similares foram obtidos quando os anti-soros foram avaliados pelo ensaio SBA (Figura 1B). Mais uma vez valores de GMT mais altos foram obtidos usando conjugados preparados a partir de MenY
10 microfluidizado.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um dos sorogrupos A, C, W135 e Y compreendendo polissacarídeos capsulares do sorogrupo C de *N. meningitidis* tendo um tamanho médio de acima de 75 kDa conjugados a uma proteína carreadora para produzir um conjugado de polissacarídeo capsular de *N. meningitidis*, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa ou 130 kDa.

2. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um dos sorogrupos A, C, W135 e Y conjugados a uma proteína carreadora para formar conjugados de *N. meningitidis*, em que cada polissacarídeo de *N. meningitidis* é um polissacarídeo nativo ou é ajustado por um fator de não mais do que x10.

3. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que cada polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* é um polissacarídeo nativo.

4. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que pelo menos um polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* é ajustado pela microfluidização.

5. Composição imunogênica de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que cada polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* é ajustado por um fator de não mais do que x10.

6. Composição imunogênica de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que os conjugados de *N. meningitidis* são fabricados a partir de uma mistura de polissacarídeos nativos e polissacarídeos que são ajustados por um fator de não mais do que x10.

7. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 6,

caracterizada pelo fato de que os polissacarídeos capsulares do sorogrupo Y são ajustados por um fator de não mais do que x10.

8. Composição imunogênica de acordo com as reivindicações 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que os polissacarídeos capsulares dos sorogrupos A e C são nativos e os polissacarídeos dos sorogrupos W135 e Y são ajustados por um fator de não mais do que x10.

9. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o tamanho médio de cada polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* está entre 50 kDa e 300 kDa ou 50 kDa e 200 kDa.

10. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizada pelo fato de que compreende um polissacarídeo capsular MenA tendo um tamanho médio acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa ou um tamanho médio dentre 50 e 100 kDa ou de 55 a 90 kDa ou de 60 a 80 kDa.

11. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizada pelo fato de que compreende um polissacarídeo capsular MenC tendo um tamanho médio acima de 100 kDa ou entre 100 e 200 kDa, de 100 a 150 kDa, de 80 a 120 kDa, de 90 a 110 kDa, de 150 a 200 kDa, de 120 a 240 kDa, de 140 a 220 kDa, de 160 a 200 kDa ou de 190 a 200 kDa.

12. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizada pelo fato de que compreende um polissacarídeo capsular MenY, tendo um tamanho médio acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa ou entre 60 a 190 kDa ou de 70 a 180 kDa ou de 80 a 170 kDa ou de 90 a 160 kDa ou de 100 a 150 kDa, de 110 a 145 kDa ou de 120 a 140 kDa.

13. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizada pelo fato de que compreende um

polissacarídeo capsular MenW tendo um tamanho médio acima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa ou entre 60 e 190 kDa ou de 70 a 180 kDa ou de 80 a 170 kDa ou de 90 a 160 kDa ou de 100 a 150 kDa, de 140 a 180 kDa, de 150 a 170 kDa ou de 110 a 140 kDa.

14. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que cada polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* é conjugado a uma proteína carreadora independentemente selecionada do grupo que consiste de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT e proteína D.

15. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que cada polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* é conjugado à mesma proteína carreadora selecionada do grupo que consiste de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT e proteína D.

16. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que ainda compreende um sacarídeo capsular da *H. influenzae b* conjugado a uma proteína carreadora.

17. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o sacarídeo capsular da *H. influenzae b* é conjugado a uma proteína carreadora selecionada do grupo que consiste de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT e proteína D.

18. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende um conjugado de sacarídeo de Hib e pelo menos dois outros conjugados de sacarídeo bacterianos em que o conjugado de Hib está presente em uma dose mais baixa do que a dose média dos pelo menos dois outros conjugados de sacarídeo bacterianos.

19. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação

18, caracterizada pelo fato de que o conjugado de Hib está presente em uma dose mais baixa do que a dose de cada um dos pelo menos dois outros conjugados de sacarídeo bacterianos.

20. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 19, caracterizada pelo fato de que a mesma proteína carreadora é usada no conjugado de Hib e dois ou mais dos pelo menos dois outros conjugados de sacarídeo bacteriano.

21. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, caracterizada pelo fato de que compreende uma preparação da vesícula de membrana externa ou sacarídeo capsular do sorogrupo B de *N. meningitidis*.

22. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende a composição imunogênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 21 e um carreador farmacêuticamente aceitável.

23. Kit de vacina para a administração concomitante ou sequencial, caracterizado pelo fato de que compreende duas composições imunogênicas multivalentes para conferir proteção em um hospedeiro contra a doença causada pela *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*, o dito kit compreendendo um primeiro recipiente que compreende:

toxóide do tétano (TT),

toxóide da difteria (DT), e

componentes da coqueluche de célula inteira ou acelular

e um segundo recipiente que compreenda:

a composição imunogênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 21.

24. Composição imunogênica de acordo com as reivindicações de 1 a 21, caracterizada pelo fato de que é para o uso no tratamento ou prevenção da doença causada pela infecção por *Neisseria meningitidis*.

RESUMO

“COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, E, KIT DE VACINA PARA A ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE OU SEQUÊNCIAL”

O presente pedido divulga uma composição imunogênica que compreende polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de pelo menos um dos sorogrupos A, C, W135 e Y conjugados a uma proteína carreadora para produzir um conjugado de polissacarídeo capsular de *N. meningitidis*, em que o tamanho médio de cada polissacarídeo de *N. meningitidis* está acima de 50 kDa.