

(11) Número de Publicação: **PT 1740217 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61K 39/95** (2011.01) **A61K 47/48** (2011.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2005.04.29</b>	(73) Titular(es): <b>NOVARTIS AG</b> <b>LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL</b>	<b>CH</b>
(30) Prioridade(s): <b>2004.04.30 GB 0409750</b> <b>2005.01.14 GB 0500787</b>		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2007.01.10</b>	(72) Inventor(es): <b>CAMERON MARSHALL</b>	<b>GB</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.06.15</b> <b>146/2011</b>	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA</b>	<b>PT</b>

**(54) Epígrafe: VACINAÇÃO MENINGOCÓCICA CONJUGADA**

**(57) Resumo:**

SACÁRIDOS CAPSULARES MENINGOCÓCICOS CONJUGADOS SERÃO INTRODUZIDOS EM PROGRAMAS DE IMUNIZAÇÃO NO FUTURO PRÓXIMO, MAS O FENÓMENO DE "SUPRESSÃO PELA PROTEÍNA TRANSPORTADORA" DEVE SER TRATADO EM PRIMEIRO LUGAR, PARTICULARMENTE NOS CASOS EM QUE VÃO SER UTILIZADOS CONJUGADOS MÚLTIPLOS. DESCOBRIU-SE QUE TOXÓIDE DA DIFTERIA E SEUS DERIVADOS (TAL COMO CRM 197) PODEM SER UTILIZADOS DE MANEIRA SEGURA COMO PROTEÍNA TRANSPORTADORA, MESMO QUANDO CONJUGADOS MENINGOCÓCICOS MÚLTIPLOS SÃO ADMINISTRADOS AO MESMO TEMPO E QUANDO UM PACIENTE FOI EXPOSTO PREVIAMENTE À PROTEÍNA TRANSPORTADORA, NA FORMA DE UM IMUNOGÉNIO PRÉVIO (POR EXEMPLO, NUMA VACINA DTP) OU COMO UMA PROTEÍNA TRANSPORTADORA PRÉVIA (POR EXEMPLO, NUMA VACINA CONJUGADA HIB OU PNEUMOCÓCICA). A INVENÇÃO PROPORCIONA UM MÉTODO PARA IMUNIZAR UM PACIENTE, QUE COMPREENDE A ADMINISTRAÇÃO DE CONJUGADOS MÚLTIPLOS DE SACÁRIDOS MENINGOCÓCICOS CAPSULARES, EM QUE CADA CONJUGADO COMPREENDE UMA PROTEÍNA TRANSPORTADORA QUE É TOXÓIDE DA DIFTERIA (OU UM SEU DERIVADO), E O SACÁRIDO CAPSULAR, E EM QUE O PACIENTE FOI PRÉ-IMUNIZADO COM UM TOXÓIDE DA DIFTERIA (OU SEU DERIVADO).

**RESUMO****"VACINAÇÃO MENINGOCÓCICA CONJUGADA"**

Sacáridos capsulares meningocócicos conjugados serão introduzidos em programas de imunização no futuro próximo, mas o fenómeno de "supressão pela proteína transportadora" deve ser tratado em primeiro lugar, particularmente nos casos em que vão ser utilizados conjugados múltiplos. Descobriu-se que toxóide da difteria e seus derivados (tal como CRM 197) podem ser utilizados de maneira segura como proteína transportadora, mesmo quando conjugados meningocócicos múltiplos são administrados ao mesmo tempo e quando um paciente foi exposto previamente à proteína transportadora, na forma de um imunogénio prévio (por exemplo, numa vacina DTP) ou como uma proteína transportadora prévia (por exemplo, numa vacina conjugada Hib ou pneumocócica). A invenção proporciona um método para imunizar um paciente, que compreende a administração de conjugados múltiplos de sacáridos meningocócicos capsulares, em que cada conjugado compreende uma proteína transportadora que é toxóide da difteria (ou um seu derivado), e o sacárido capsular, e em que o paciente foi pré-imunizado com um toxóide da difteria (ou seu derivado).

## DESCRICAÇÃO

### "VACINAÇÃO MENINGOCÓCICA CONJUGADA"

#### **CAMPO TÉCNICO**

Esta invenção refere-se a vacinas contra *Neisseria meningitidis*. Em particular, refere-se a vacinas conjugadas à base de sacáridos capsulares de sorogrupos meningocócicos múltiplos.

#### **TÉCNICA ANTERIOR**

Com base no polissacárido capsular do organismo, doze sorogrupos de *N. meningitidis* foram identificados (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y e Z). O grupo A é o patogénio mais frequentemente implicado em doença epidémica na África subsaariana. Os sorogrupos B e C são responsáveis pela grande maioria de casos nos E.U.A. e na maioria dos países desenvolvidos. Os sorogrupos W135 e Y são responsáveis pelo restante dos casos nos E.U.A. e países desenvolvidos.

Uma vacina tetravalente de polissacáridos capsulares dos sorogrupos A, C, Y e W135 existe há muitos anos [1,2]. Embora eficaz em adolescentes e adultos, induz uma resposta imune pobre e curta duração de protecção e não pode ser utilizada em bebés [por exemplo, ref. 3] porque polissacáridos são抗igénios independentes das células T que induzem uma resposta imune fraca que não pode ser reforçada. Os polissacáridos nesta vacina não são conjugados [4].

As vacinas conjugadas contra o sorogrupo C foram aprovadas para utilização en seres humanos, e incluem Menjugate™ [5], Meningitec™ e NeisVac-C™. Misturas de conjugados dos sorogrupos A+C são conhecidas [6-8] e misturas de conjugados de sorogrupos A+C+W135+Y foram descritas [9-13].

Embora conjugados meningocócicos sejam bem conhecidos, ainda não foram incluídos nos programas de imunização pediátricos existentes, que para países desenvolvidos tipicamente envolvem: vacina da hepatite B no nascimento; e, a partir dos 2 meses, todas de difteria/tétanos/pertussis (D-T-P), conjugado de *H. influenzae* tipo b (Hib), vírus da pólio inactivado e conjugados de pneumococos aos 2 meses.

Quando se adicionam vacinas conjugadas a programas de imunização existentes, no entanto, a questão de supressão epitópica induzida pela proteína transportadora (ou "supressão pela proteína transportadora", como é geralmente conhecido) deve ser tratada, particularmente supressão surgindo por pré-exposição à proteína transportadora. "Supressão pela proteína transportadora" é o fenómeno pelo qual a pré-imunização de um animal com uma proteína transportadora impede esta de provocar uma resposta imune contra um novo epítopo antigénico que é apresentado naquela proteína transportadora [14].

Como referido na referência 15, onde diversas vacinas de antigénio contêm o mesmo componente proteico (sendo utilizado como um imunogénio e/ou como uma proteína transportadora num conjugado) então existe o potencial para interferência entre aqueles antigénios. Na referência 15, a resposta imune contra um antigénio que foi conjugado com um toxóide de tétano (Tt) foi suprimido por imunidade pré-existente contra Tt.

A referência 16 descreve como uma combinação de vacinas D-T-P com uma vacina de conjugado Hib foi afectada de modo adverso quando a proteína transportadora para o conjugado de Hib era a mesma que o antigénio tetânico da vacina D-T-P. Os autores concluem que este fenómeno de "supressão pela proteína transportadora", que surge a partir da interferência por uma proteína transportadora

comum, deve ser tido em consideração quando são introduzidas vacinas que incluem conjugados múltiplos.

Em contraste com as referências 15 e 16, a referência 17 relatou que a sensibilização com toxóide de tétano não teve impacto negativo na resposta imune contra um conjugado Hib-Tt subsequentemente administrado, mas a supressão foi observada em pacientes com anticorpos anti-Tt adquiridos maternalmente. Na referência 18, no entanto, um efeito de "supressão epítópica" foi referido para um conjugado peptídico à base de Tt em pacientes que tinha anticorpos anti-Tt existentes resultantes de vacinação contra o tétano.

Na referência 19, foi sugerido que um conjugado que tem CRM197 (um mutante destoxicificado de toxina da difteria) como proteína transportadora pode ser ineficaz em crianças que não tenham sido previamente expostas a toxina da difteria como parte de uma vacina (por exemplo, como parte de uma vacina D-T-P ou D-T). Este trabalho foi adicionalmente desenvolvido na referência 20, onde se observou que um efeito de sensibilização à proteína transportadora por imunização D-T persistiu na imunização subsequente com conjugados de Hib.

Na referência 21, os autores descobriram que a pré-imunização com uma proteína transportadora de toxóide de difteria ou de tétano reduziu o aumento nos níveis de anticorpo anti-Hib após uma imunização subsequente com o sacárido capsular de Hib conjugado com aquelas proteínas transportadoras, sendo igualmente afectadas tanto com IgG1 como IgG2. Respostas às porções de proteína transportadora dos conjugados foram também suprimidas. Além disso, observou-se uma supressão não específica de epítopo mais geral, uma vez que pré-imunização com um conjugado afectou as respostas imunes contra tanto as porções de proteína transportadora como de sacárido de um segundo conjugado que foi administrado quatro semanas mais tarde.

A utilização de diferentes proteínas transportadoras numa única vacina conjugada de pneumocócico multivalente é referida na referência 22, sendo utilizadas várias proteínas transportadoras a fim de evitar o fenómeno de supressão pela proteína transportadora. Os autores predizem que existe uma carga máxima de uma proteína transportadora que pode ser tolerada numa vacina conjugada multivalente sem que surja interferência negativa. Na referência 23 foi relatado que vacinas conjugadas pneumocócicas incluindo proteínas transportadoras misturadas provocaram, em paralelo à resposta anti-pneumocócica, respostas de reforço não intencionais contra as proteínas transportadoras.

Na referência 24, uma investigação de se provocadores difteria e tétanos poderiam ser administrados com conjugados meningocócicos do sorogrupo C mono-valentes, encontrou-se que as titulações contra o conjugado meningocócico foram reduzidos onde o portador foi portador de toxóide de tétano e o paciente recebeu imunização prévia com uma vacina contendo tétanos.

Finalmente, a referência 25 reporta que "exposição prévia à proteína portadora pode potenciar ou suprimir a resposta de anticorpo a polissacáridos administrados em conjugados de sacárido-proteína". Os conjugados utilizados na referência 25 utilizaram toxóide de tétano ou o mutante CRM197 como proteína portadora.

A situação a respeito de sensibilização e/ou supressão de portador é assim confusa, e permanece não claro se qualquer conjugado particular sofreria de supressão de portador ou se beneficiará de um potenciamento de sensibilização de portador. Vacinas de conjugado meningocócico não estarão numa posição a ser integrada em ou adicionada a programas de imunização pediátricos existentes até que esta questão seja tratada. Além disso, como conjugados meningocócicos são para ser administrados como misturas tetravalentes (isto é, quatro conjugados

diferentes) então o potencial para supressão de portador se torna mais que um risco.

Além do problema de sensibilização com um portador que têm um impacto negativo sobre respostas imunes contra conjugados de sacárido, o inverso também pode ocorrer isto é, imunização com um conjugado pode ter um impacto negativo sobre respostas imunes contra o portador [26].

O documento WO 03/094834 divulga composições imunogénicas que compreendem (a) um antigénio de sacárido capsular do sorogrupo C de *N. meningitidis*, e (b) um adjuvante de quitosano. As composições são ditas preferentemente para compreender (c) um ou mais antigénios adicionais e/ou (d) um ou mais adjuvantes adicionais. As composições são ditas que são particularmente adequadas para administração na mucosa, incluindo administração intranasal. O documento WO 03/094834 também divulga composições imunogénicas para administração na mucosa que compreende sacáridos capsulares de pelo menos dois dos sorogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. É dito que são preferidos os sacáridos capsulares nas composições da invenção a ser conjugado a proteína(s) portadora(s) e/ou a ser oligossacáridos. Antigénios de oligossacárido conjugado são ditos que são particularmente preferidos.

#### **DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO**

A Referência 27 sugere que a supressão de portador em vacinas de conjugado meningocócico deve ser tratada utilizando mais de um tipo de proteína portadora. Em particular, a referência 27 sugere que proteína D de *H. influenzae* deveria ser utilizada como a proteína portadora para conjugados meningocócicos, com toxóide de tétano (Tt) também sendo uma possibilidade. Para evitar a supressão de epítopo, a proteína D é também o portador de escolha na referência 28. De maneira similar, a referência 29 sugere que fímbrias de *Bordetella pertussis* deveriam ser

utilizadas como o portador a fim de evitar a supressão de portador em vacinas conjugadas multivalentes. Em contraste, encontrou-se que toxóide de difteria (Dt) e seus derivados podem de maneira segura ser utilizados como o portador para conjugados de sacárido meningocócico, mesmo onde conjugados meningocócicos múltiplos são administrados ao mesmo tempo. Nenhum dos conjugados meningocócicos do sorogrupo C monovalentes estudados na referência 24 utilizou um portador Dt.

Além disso, a referência 27 também sugere que vacinas de conjugado meningocócico deveriam ser administradas ao mesmo tempo que vacinas D-T-P-Hib (por exemplo, veja-se o exemplo 3), tal que não existiria exposição prévia a proteína portadora dos conjugados meningocócicos. Em contraste, encontrou-se agora que conjugados meningocócicos podem ser administrados a pacientes mesmo onde já receberam a proteína portadora, na forma de um imunogénio prévio (por exemplo, numa imunização de D-T-P ou um D-T) ou como uma proteína portadora prévia (por exemplo, numa vacina de conjugado de Hib ou conjugado pneumocócico). O estudo prévio de supressão epitópica induzida por portador em vacinas de conjugado do sorogrupo C monovalentes [24] não considerou o efeito de qualquer administração anterior de conjugados.

Bem como contrastante com a referência 27, a capacidade de um paciente de desenvolver uma resposta imune contra um conjugado meningocócico, mesmo onde já receberam um conjugado diferente, contrasta com referência a 21.

Assim a invenção proporciona uma composição que comprehende: (a) um conjugado de (i) o sacárido capsular de sorogrupo A de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria; (b) um conjugado de (i) o sacárido capsular de sorogrupo C de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado

do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria; (c) um conjugado de (i) o sacárido capsular de sorogrupo W135 de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria; e (d) um conjugado de (i) o sacárido capsular de sorogrupo Y de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria, para utilização num método para imunizar um paciente contra uma doença causada por *Neisseria meningitidis*, que compreende a etapa de administrar ao paciente a composição, em que o paciente foi pré-imunizado com (a) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria e/ou (b) um conjugado de (i) um sacárido capsular de um organismo diferente de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria.

A invenção também proporciona a utilização de: (a) um conjugado de (i) o sacárido capsular de sorogrupo A de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria; (b) um conjugado de (i) o sacárido capsular de sorogrupo C de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria; (c) um conjugado de (i) o sacárido capsular de sorogrupo W135 de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria; e (d) um conjugado de (i) o sacárido capsular de sorogrupo Y de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do

mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria, no fabrico de um medicamento para imunizar um paciente contra uma doença causada por *Neisseria meningitidis* em que o paciente foi pré-imunizado com (a) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria e/ou (b) um conjugado de (i) um sacárido capsular de um organismo diferente de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria.

A doença meningocócica é preferentemente meningite, mais preferentemente meningite bacteriana, e o mais preferentemente meningite meningocócica. Assim, a invenção pode ser utilizada para proteger contra infecções meningocócicas que causam meningite.

Onde o antigénio de pré-imunização é um derivado de um toxóide de difteria que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com Dt, então esse derivado é preferentemente CRM197.

#### *O paciente pré-imunizado*

O paciente a ser imunizado foi pré-imunizado com: (a) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria; e/ou (b) um conjugado de (i) um sacárido capsular de um organismo diferente de *Neisseria meningitidis* e (ii) um toxóide de difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo de forma cruzada imunologicamente com toxóide de difteria. A pré-imunização típica terá incluído: um antigénio de toxóide de difteria; um conjugado de sacárido capsular de Hib utilizando um toxóide de difteria ou portador CRM197; e/ou um conjugado de sacárido capsular pneumocócico utilizando um toxóide de difteria ou portador CRM197.

O paciente receberá pelo menos uma (por exemplo, 1, 2, 3 ou mais) dose do(s) antigénio(s) de pré-imunização, e essa dose (ou as anteriores de doses múltiplas) serão administradas ao paciente pelo menos seis (por exemplo, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48, 60, 120, 180, 240, 300 ou mais) meses antes da imunização com os conjugados meningocócicos de acordo com a invenção. Num grupo de pacientes preferido, a pré-imunização ocorre dentro de 3 anos desde o nascimento, por exemplo, dentro de 2 anos desde o nascimento, dentro de 1 ano desde o nascimento, dentro de 6 meses desde o nascimento, ou mesmo dentro de 3 meses, 2 meses ou 1 mês desde o nascimento.

O paciente a ser imunizado de acordo com a invenção tipicamente será um ser humano. O ser humano geralmente terá pelo menos 1 mês de idade, por exemplo, pelo menos 2 meses de idade, pelo menos 3 meses de idade, pelo menos 4 meses de idade, pelo menos 6 meses de idade, pelo menos 2 anos de idade, pelo menos 5 anos de idade, pelo menos 11 anos de idade, pelo menos 17 anos de idade, pelo menos 40 anos de idade, pelo menos 55 anos de idade, etc. Um conjunto preferido de pacientes tem pelo menos 6 meses de idade. Outro conjunto preferido de pacientes está no grupo de idade de 2-55 anos de idade, e outro conjunto preferido de pacientes está no grupo de idade de 11-55 anos de idade. Um conjunto adicional preferido de pacientes tem menos de 11 anos de idade, por exemplo, 2-11 anos de idade. Em todos os casos, no entanto, independentemente da idade, o paciente será pré-imunizado como definidos no presente documento.

Onde o antigénio de pré-imunização é um toxóide de difteria então o paciente tipicamente receberá o toxóide como o antigénio 'D' numa D-T-P ou uma pré-imunização D-T. Tais imunizações são tipicamente dadas a crianças recém-nascidas em idades de 2, 3, e 4 meses. Onde a imunização inclui uma vacina contra tosse convulsa, essa vacina pode

ser uma célula completa ou vacina celular contra tosse convulsa ('Pw'), mas é preferentemente uma vacina acelular contra tosse convulsa ('Pa'). Vacinas Pa de pré-imunização geralmente incluirão um, dois ou três dos seguintes抗igénios bem conhecidos e bem caracterizados de *B. pertussis*: (1) toxóide pertussis ('PT'), destoxificado por meios químicos ou mutagénese de sítio dirigido, por exemplo, o mutante '9K/129G' [30]; (2) hemaglutinina filamentosa ('FHA'); (3) pertactina (também conhecida como 'proteína de membrana externa de 69 kiloDalton'). Vacinas acelulares contra tosse convulsa podem também incluir aglutinogénio 2 e/ou aglutinogénio 3. O抗igénio 'T' numa pré-imunização D-T-P é tipicamente um toxóide de tétano.

Onde o抗igénio de pré-imunização é um toxóide de difteria então o paciente pode também ou alternativamente ter recebido o toxóide como a proteína portadora de uma conjugado de proteína-sacárido. Tais conjugados incluem o conjugado de Hib'PRP-D' [veja-se o Quadro 14-7 da ref. 32], por exemplo, o produto ProHIBIT™.

Onde o抗igénio de pré-imunização é CRM197 então o paciente tipicamente será pré-imunizado com um conjugado de Hib e/ou um conjugado pneumocócico multivalente. Tais imunizações são tipicamente dadas a crianças recém-nascidas em idades de 2, 3, e 4 meses. Conjugados de Hib que utilizam um portador CRM197 incluem os conjugados 'HbOC' [Quadro 14-7 da ref. 32], por exemplo, o produto HibTITER™. Conjugados pneumocócicos que utilizam um portador CRM197 incluem as misturas PCV77-valente, por exemplo, a vacina PrevNar™ [31]. O paciente pode também ter sido pré-imunizado com um conjugado meningocócico do sorogrupo C ('MenC'). Conjugados MenC que utilizam portador CRM197 incluem Meninvact™/Menjugate™ [5] e Meningitec™. Preferentemente, no entanto, o paciente foi pré-imunizado com Hib e/ou conjugado pneumocócico, mas não com um conjugado MenC. Se o paciente foi pré-imunizado com um

conjugado MenC então a vacina administrada de acordo com a invenção pode ou pode não incluir um conjugado do sorogrupo C.

Onde a pré-imunização foi com um antigénio conjugado então o paciente quase inevitavelmente também receberá uma pequena quantidade de toxóide de difteria livre (ou derivado) como um resultado de contaminação de baixo nível do conjugado (por exemplo, causada por hidrólise do conjugado durante armazenamento), mas esta pequena quantidade tipicamente não será adequada para proporcionar uma resposta imune significativa.

O toxóide de difteria é uma proteína bem conhecida e bem caracterizada [por exemplo, veja-se o capítulo 13 da ref. 32] que pode ser obtida pelo tratamento da exotoxina de ribosilação de ADP de *Corynebacterium diphtheriae* com um produto químico inactivante, tal como formalina ou formaldeído. CRM197 é também bem conhecido e bem caracterizado [33-36], e foi amplamente utilizado como um portador em vacinas de sacárido conjugado. CRM197 e Dt compartem muitos epítopos de portador.

O resultado da pré-imunização é que o sistema imune do paciente foi exposto aos antigénios de pré-imunização. Para a pré-imunização com toxóide de difteria (Dt), isto geralmente significa que o paciente desenvolverá uma resposta de anticorpo anti-Dt (tipicamente para dar uma titulação anti-Dt  $>0,01$  UI/ml) e possuirá linfócitos B e/ou T de memória específicos para Dt isto é, pré-imunização com Dt é tipicamente adequada para provocar uma resposta imune anti-Dt anamnéstica no paciente. Para a pré-imunização onde Dt (ou derivado) é um portador para um sacárido dentro de um conjugado então a pré-imunização desenvolverá uma resposta anti-sacárido e o paciente possuirá linfócitos B e/ou T de memória específicos para o sacárido isto é, a pré-imunização é tipicamente adequada para provocar uma resposta imune anti-sacárido anamnéstica no paciente. A

pré-imunização foi preferentemente adequada para provocar imunidade protectora no paciente, por exemplo, contra a doença difteria.

Assim, os pacientes a serem imunizados de acordo com a invenção são distintos dos pacientes em geral, uma vez que são membros de um subconjunto da população geral cujos sistemas imunes já montaram uma resposta imune aos抗igenios de pré-imunização, tal que a imunização de acordo com a invenção com um conjugado meningocóccico que inclui um portador de toxóide de difteria (ou derivado) provoca uma resposta imune diferente no subconjunto do que a resposta em pacientes que não anteriormente montaram uma resposta imune aos抗igenios de pré-imunização. Os pacientes que foram pré-imunizados com Dt (ou derivado) como o portador de um conjugado (particularmente de um conjugado de Hib) são preferidos. Os pacientes particularmente preferidos foram pré-imunizados com Dt (ou derivado) como o portador de um conjugado e também com Dt como um imunogénio não conjugado.

O paciente pode ter sido pré-imunizado com outros抗igenios além de serem pré-imunizados com um toxóide de difteria (ou derivado), em forma conjugada ou não conjugada. Tais抗igenios incluem, mas não são limitadas a:抗igenio(s) de pertussis - veja-se anteriormente; toxóide de tétano - veja-se anteriormente; *Haemophilus influenzae* tipo B - veja-se anteriormente;抗igenio de superfície da hepatite B (HBsAg); poliovírus, tal como uma vacina do vírus da pólio inactivado (IPV); *Streptococcus pneumoniae* - veja-se anteriormente; influenza vírus; BCG;抗igenios do vírus da hepatite A; vírus do sarampo; vírus da papeira; vírus da rubéola; vírus da varicela; etc.

O paciente pode ter sido pré-imunizado ou não com um ou mais conjugados meningocócicos. Em algumas formas de realização preferidas, no momento em que um paciente primeiro recebe um conjugado meningocóccico, já foi pré-

imunizado com Dt (ou derivado). Em outras formas de realização, um conjugado meningocócico é administrado a um paciente que já foi pré-imunizado com tanto (i) Dt ou um derivado como (ii) um conjugado meningocócico.

### **Os conjugados**

A invenção imuniza pacientes com sacáridos conjugados. A conjugação é utilizada para aumentar a imunogenicidade de sacáridos, uma vez que converte os mesmos de抗原 independentes de T a抗原 dependentes de T, assim permitindo a sensibilização para memória imunológica. A conjugação é particularmente útil para vacinas pediátricas [por exemplo, ref. 37] e é uma técnica bem conhecida [por exemplo, revista nas refs. 38 a 46].

A composição utilizada de acordo com a invenção compreende pelo menos dois conjugados meningocócicos, em que cada conjugado compreende uma proteína portadora de toxóide de difteria (ou derivado), e o sacárido capsular. Os sacáridos capsulares são escolhidos de sorogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, tal que as composições incluem sacáridos de 2, 3, ou todos 4 destes quatro sorogrupos. As composições específicas compreendem sacáridos de: sorogrupos A & C; sorogrupos A & W135; sorogrupos A & Y; sorogrupos C & W135; sorogrupos C & Y; sorogrupos W135 & Y; sorogrupos A & C & W135; sorogrupos A & C & Y; sorogrupos A & W135 & Y; sorogrupos C & W135 & Y; sorogrupos A & C & W135 & Y. As composições incluindo sacáridos de todos os quatro sorogrupos são os mais preferidos.

Os sacáridos capsulares de cada um destes quatro sorogrupos são bem caracterizados. O sacárido capsular de meningococos de sorogrupo A é um homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ )-ligado, com O-acetilação parcial nas posições C3 e C4. Os grupos acetilo podem ser substituídos com grupos de bloqueio para prevenir a hidrólise [47], e tais sacáridos modificados são ainda

sacáridos de sorogrupo A dentro do significado da presente invenção. O sacárido capsular de sorogrupo C é um homopolímero de ácido siálico ( $\alpha$  2 → 9)-ligado (ácido N-acetil neuramínico, ou 'NeuNAc'). A maioria das estirpes de sorogrupo C tem grupos O-acetilo em C-7 e/ou C-8 dos resíduos do ácido siálico, mas aproximadamente 15% de isolados clínicos não possuem estes grupos O-acetilo [48, 49]. A estrutura de sacárido é escrita como →9)-Neu p NAc 7/8 OAc-( $\alpha$ 2→. O sacárido de sorogrupo W135 é um polímero de unidades de ácido siálico-disacárido galactose. Como o sacárido de sorogrupo C, tem O-acetilação variável, mas nas posições 7 e 9 do ácido siálico [50]. A estrutura é escrita como: →4)-D-Neup5Ac(7/90Ac)- $\alpha$ -(2→6)-D-Gal- $\alpha$ -(1→. O sacárido de sorogrupo Y é similar ao sacárido de sorogrupo W135, excepto que a unidade de repetição de dissacárido inclui glucose ao invés de galactose. Como o sorogrupo W135, tem variável O-acetilação nas posições 7 e 9 do ácido siálico [50]. A estrutura do sorogrupo Y é escrita como: →4)-D-Neup5Ac(7/90Ac)- $\alpha$ -(2→6)-D-Glc- $\alpha$ -(1→.

Os sacáridos utilizados de acordo com a invenção podem ser O-acetilados como foi descrito anteriormente (por exemplo, com o mesmo padrão de O-acetilação como visto em sacáridos capsulares nativos), ou podem ser parcialmente ou totalmente des-O-acetilados numa ou mais posições dos anéis de sacárido, ou podem ser hiper-O-acetilados em relação aos sacáridos capsulares nativos.

Os sacáridos utilizados de acordo com a invenção são preferentemente mais curtos que os sacáridos capsulares nativos vistos em bactérias. Assim, os sacáridos são preferentemente despolimerizados, com a despolimerização ocorrendo após a purificação, mas antes da conjugação. A despolimerização reduz o comprimento da cadeia dos sacáridos. Um método de despolimerização preferido envolve a utilização de peróxido de hidrogénio [9]. O peróxido de hidrogénio é adicionado a um sacárido (por exemplo, para

dar uma concentração final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1%), e a mistura é então incubada (por exemplo, em aproximadamente 55°C) até que uma redução desejada do comprimento da cadeia tenha sido alcançada. Outro método de despolimerização envolve hidrólise de ácido [10]. Outros métodos de despolimerização são conhecidos ao perito. Os sacáridos utilizados para preparar conjugados para utilização de acordo com a invenção podem ser obteníveis por qualquer destes métodos de despolimerização. A despolimerização pode ser utilizada a fim de proporcionar um comprimento óptimo da cadeia para a imunogenicidade e/ou para reduzir o comprimento da cadeia para o manejo físico dos sacáridos.

As proteínas portadoras típicas para utilização em conjugados são toxóides ou toxinas bacterianas, tal como toxina de difteria (ou seu mutante CRM<sub>197</sub>) e toxina do tétano. Outras proteínas portadoras conhecidas incluem a proteína de membrana exterior de *N. meningitidis*, péptidos sintéticos, proteínas de choque térmico, proteínas de pertussis, citocinas, linfocinas, hormonas, factores de crescimento, proteínas artificiais que compreendem múltiplos epítopos de célula T CD4<sup>+</sup> humana de vários抗原s derivados de patogénio, proteína D de *H. influenzae*, proteína de superfície pneumocócica PspA, proteínas de absorção de ferro, toxina A ou B de *C. difficile*, etc. De acordo com a invenção, no entanto, os conjugados meningocócicos incluem uma proteína portadora de toxóide de difteria (ou derivado, tal como CRM197). A conjugação covalente é preferida.

É possível utilizar mais de uma proteína portadora nas composições. Assim, proteínas portadoras diferentes podem ser utilizadas para sorogrupo diferentes, por exemplo, sacáridos de sorogrupo A poderiam ser conjugados a CRM197 enquanto sacáridos de sorogrupo C poderiam ser conjugados a toxóide de difteria. É também possível utilizar mais de uma proteína portadora para um抗原 de sacárido

particular, por exemplo, sacáridos de sorogrupo A poderiam ser em dois grupos, com algum conjugado a CRM197 e outro conjugado a toxóide de difteria. Em geral, no entanto, é preferido utilizar a mesma proteína portadora para todos os sacáridos meningocócicos na composição, e mais preferentemente para todos os sacáridos (isto é, incluindo quaisquer conjugados não meningocócicos que podem estar presentes). É preferido que as composições da invenção não incluam qualquer proteína portadora de toxóide de tétano. Onde a composição inclui uma proteína portadora de toxóide de difteria então é preferido que não inclua qualquer proteína portadora de CRM 197.

Uma única proteína portadora poderia portar mais de um抗igénio de sacárido [51]. Por exemplo, uma única proteína portadora poderia ter conjugada à mesma sacáridos dos sorogrupos A e C. Para alcançar este objectivo, os sacáridos podem ser misturados antes da reacção de conjugação. Em geral, no entanto, é preferido que tenha conjugados separados para cada sorogrupo. Os conjugados são preferentemente misturados para dar substancialmente uma razão 1:1:1:1 (medida como massa de sacárido), por exemplo, a massa de cada sacárido de sorogrupo está dentro de  $\pm 10\%$  uma da outra. Uma quantidade típica de抗igénio meningocócico por sorogrupo numa composição é entre 1  $\mu\text{g}$  e 20  $\mu\text{g}$ , por exemplo, entre 2 e 10  $\mu\text{g}$  por sorogrupo, ou aproximadamente 4  $\mu\text{g}$ . Como uma alternativa a uma razão 1:1:1:1, uma dose dupla de sorogrupo A pode ser utilizada (2:1:1:1).

Os conjugados com uma razão de sacárido:proteína (p/p) de entre 1:15 (isto é, proteína em excesso) e 15:1 (isto é, sacárido em excesso), preferentemente entre 1:10 e 10:1, mais preferentemente entre 1:5 e 5:1, são preferidos. Proteína portadora em excesso é preferida. Os conjugados com razão de sacárido:proteína de aproximadamente 1:12 ou aproximadamente 1:6 ou aproximadamente 1:3 são preferidos,

particularmente onde o portador é Dt. Uma razão 1:3 é a mais preferida.

Os conjugados podem ser utilizados em conjunto com proteína portadora livre [52]. Quando uma dada proteína portadora está presente tanto em forma livre como conjugada numa composição da invenção, no entanto, a forma não conjugado é preferentemente não mais de 5% da quantidade total da proteína portadora na composição como um todo, e mais preferentemente presente em menos de 2% em peso. De maneira similar, sacárido não conjugado é preferentemente não mais de 15% em peso da quantidade total de sacárido.

Qualquer reacção de conjugação adequada pode ser utilizada, com qualquer *linker* adequado onde for necessário.

O sacárido será tipicamente activado ou funcionalizado antes da conjugação. A activação pode envolver, por exemplo, reagentes de cianilação tal como CDAP (por exemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridínio [53, 54, etc.]). Outras técnicas adequadas usam carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzóico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; veja-se também a introdução à referência 44).

Ligações via um grupo *linker* podem ser feitas utilizando qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos descritos nas referências 55 e 56. Um tipo de ligação envolve aminação redutora do polissacárido, acoplando o grupo amino resultante com uma extremidade de um *linker* de grupo de ácido adípico, e então acoplando uma proteína às outras extremidades do *linker* de ácido adípico grupo [42, 57, 58]. Outros *linkers* incluem B-propionamido [59], nitrofenil-etilamina [60], haloacilo [61], ligações glicosídicas [62], ácido 6-aminocapróico [63], ADH [64], fracções C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [65] etc. Como uma alternativa à utilização de um *linker*, a ligação directa pode ser utilizada. As ligações directas à proteína podem

compreender a oxidação do polissacárido seguida por aminação redutora com a proteína, como foi descrito, por exemplo, nas referências 66 e 67.

Um processo que envolve a introdução de grupos amino no sacárido (por exemplo, por meio da substituição de grupos =O terminais com -NH<sub>2</sub>) seguida por derivatização com um diéster adípico (por exemplo, diéster N-hidroxisuccinimido de ácido adípico) e a reacção com proteína portadora é preferida.

Num método de conjugação preferido, um sacárido é feito reagir com dihidrazida de ácido adípico. Para sorogrupo A, carbodiimida pode também ser adicionada neste estágio. Após um período de reacção, cianoborohidreto de sódio é adicionado. Sacárido derivatizado pode então ser preparado, por exemplo, por meio de ultrafiltração. O sacárido derivatizado é então misturado com proteína portadora (por exemplo, com um toxóide de difteria), e carbodiimida é adicionada. Após um período de reacção, o conjugado pode ser recuperado. Detalhes adicionais deste método de conjugação podem ser encontrados na referência 10. Os conjugados obteníveis por este método são conjugados preferidos para utilização de acordo com a invenção, por exemplo, conjugados que compreendem um portador de toxóide de difteria e um *linker* de ácido adípico.

Os conjugados são preferentemente preparados separadamente e então misturados. Após a mistura, a concentração dos conjugados misturados pode ser ajustada, por exemplo, com solução salina tamponada com fosfato, livre de pirogénios estéril. Cada conjugado, antes da mistura, preferentemente contém não mais de 15 µg de portador.

O resultado de administrar conjugados meningocócicos de acordo com a invenção é preferentemente que, para cada sorogrupo administrado, o paciente desenvolve uma resposta de anticorpo bactericida sérico (SBA), com o aumento em

titulação de SBA (em comparação com o paciente pré-imunizado antes de receber os conjugados misturados meningocócicos) sendo pelo menos 4 vezes, e preferentemente pelo menos 8 vezes. O teste de SBA é um correlato padrão para protecção contra meningococos. Detalhes adicionais de correlatos sorológicos para vacinas meningocócicas são dados na referência 68.

***Componentes antigénicos adicionais de composições utilizadas de acordo com a invenção***

Além de conjugados meningocócicos, as composições utilizadas de acordo com a invenção podem opcionalmente incluir 1, 2 ou 3 dos seguintes antigénios adicionais:

1. Um sacárido capsular conjugado de *S. pneumoniae* [por exemplo, capítulo 23 de ref. 32; refs. 69-71].

Prefere-se incluir sacáridos de mais de um sorotípo de *S. pneumoniae*. Por exemplo, misturas de polissacáridos de 23 sorotípos diferentes são amplamente utilizados, como são vacinas conjugadas com polissacáridos de entre 5 e 11 sorotípos diferentes [72]. Por exemplo, PrevNar™ [31] contém antigénios de sete sorotípos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F) com cada sacárido individualmente conjugado a CRM197 por meio de aminação redutora, com 2 µg de cada sacárido por 0,5 ml de dose (4 µg de sorotípo 6B), e com conjugados adsorvidos sobre um adjuvante de fosfato de alumínio. Onde conjugados pneumocócicos são incluídos em composições para utilização com a invenção, a composição preferentemente inclui pelo menos os sorotípos 6B, 14, 19F e 23F.

2. Um sacárido capsular conjugado de *H. influenzae* B [por exemplo, capítulo 14 da ref. 32].

A proteína portadora para o conjugado podem ser CRM197, Dt, um toxóide de tétano ou um complexo de membrana externa de *N. meningitidis*. A fracção de sacárido do conjugado pode ser um polissacárido (por exemplo, fosfato de poliribosilribitol (PRP) comprimento

completo), mas prefere-se despolimerizar os polissacáridos capsulares para formar oligossacáridos (por exemplo, MW desde ~1 até ~5 kDa). Um conjugado preferido de Hib compreende um oligossacárido ligado covalentemente a CRM197 via um linker de ácido adípico [73, 74]. A administração do antigénio de Hib preferentemente resulta numa concentração anticorpo anti-PRP de > 0,15 µg/ml, e mais preferentemente > 1 µg/ml. Onde uma composição inclui um antigénio de sacárido Hib, preferentemente também não inclui um adjuvante de hidróxido de alumínio. Se a composição inclui um adjuvante de fosfato de alumínio então o antigénio de Hib pode ser adsorvido ao adjuvante [75] ou pode não ser adsorvido [27]. A prevenção de adsorção pode ser alcançada por meio da selecção do pH correto durante a mistura de antigénio/adjuvante, um adjuvante com uma carga de ponto de zero apropriada, e uma ordem apropriada de mistura para os vários antigénios diferentes numa composição [76].

3. Um antigénio de proteína de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B [por exemplo, ref. 77].

A composição pode compreender um ou mais destes antigénios adicionais.

Tais antigénios podem ou podem não ser adsorvidos a um sal de alumínio.

Se os conjugados meningocócicos estão a ser administrados numa série de doses então nenhuma, alguma ou todas as doses podem incluir estes extra antigénios.

As composições que contêm os conjugados meningocócicos preferentemente não incluem toxóide de tétano. Preferentemente, não incluem antigénios de pertussis. Preferentemente, não incluem antigénio de superfície do vírus da hepatite B. Preferentemente, não incluem poliovírus. Uma composição preferentemente contém não mais de 50 µg de toxóide de difteria por conjugado

meningocócico, e mais preferentemente não mais de 50 µg de toxóide de difteria para todos os conjugados meningocócicos combinados.

#### **A composição de vacina**

A composição utilizada de acordo com a invenção incluirá tipicamente um portador farmaceuticamente aceitável. Tais portadores incluem qualquer portador que por si mesmo não induz a produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo que recebe a composição. Portadores adequados são tipicamente macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, sucrose, trealose, lactose, e agregados de lípidos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas). Tais portadores são bem conhecidos a aqueles de técnicos ordinários na especialidade. As vacinas podem também conter diluentes, tais como água, solução salina, glicerol, etc. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsificantes, substâncias de tamponamento de pH, e similares, podem estar presentes. Solução salina fisiológica tamponada com fosfato livre de pirogénio estéril é um portador típico. Uma discussão minuciosa de portadores farmaceuticamente aceitáveis e excipientes está disponível na referência 78.

As composições utilizadas de acordo com a invenção podem incluir um antimicrobiano, particularmente se embaladas num formato de doses múltiplas.

As composições utilizadas de acordo com a invenção podem compreender detergente, por exemplo, um Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Detergentes estão geralmente presentes em níveis baixos, por exemplo, <0,01%.

As composições utilizadas de acordo com a invenção podem incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio e/ou fosfato de sódio). Estes podem ser utilizados para a

tonicidade. Uma concentração de  $10\pm2$  mg/ml de NaCl é típica, por exemplo, aproximadamente 8,8 mg/ml. Uma concentração de 1,2 mg/ml de fosfato de sódio é típica.

As composições utilizadas de acordo com a invenção incluirão geralmente um tampão, por exemplo, um tampão fosfato.

As composições utilizadas de acordo com a invenção podem compreender um álcool de açúcar (por exemplo, manitol) ou um dissacárido (por exemplo, sucrose ou trealose), por exemplo, em aproximadamente 15–30 mg/ml (por exemplo, 25 mg/ml), particularmente se são para serem liofilizados ou se incluem material que foi reconstituído a partir de material liofilizado. As composições preferidas, no entanto, não são liofilizadas isto é, todos os conjugados meningocócicos estão presentes em forma aquosa, desde o estágio de embalamento até o estágio de administração.

As composições serão geralmente administradas directamente a um paciente. A distribuição directa pode ser conseguida por injecção parentérica (por exemplo, subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, ou ao espaço intersticial de um tecido), ou por administração rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar ou outra mucosa. Prefere-se a administração intramuscular (por exemplo, à coxa ou ao braço superior). A injecção pode ser via uma agulha (por exemplo, um agulha hipodérmica), mas a injecção livre de agulha pode alternativamente ser utilizada. Uma dose intramuscular típica é 0,5 ml.

Os conjugados meningocócicos de múltiplos sorogrupos são administrados em mistura dentro de uma única composição. A composição pode ser administrada como uma única dose, ou pode ser administrada mais de uma vez numa programação de doses múltiplas. As doses múltiplas podem ser utilizadas numa programação de imunização primária e/ou

numa programação de imunização de reforço. Uma programação de dose primária pode ser seguida por uma programação de dose de reforço dos conjugados meningocócicos. A sincronização adequada entre doses de sensibilização (por exemplo, entre 4-16 semanas), e entre sensibilização e reforço, pode ser determinada rotineiramente. Os conjugados podem convenientemente ser administrados ao mesmo tempo como outras vacinas, por exemplo, ao mesmo tempo que uma vacina D-T-P, ou ao mesmo tempo que uma vacina de conjugado pneumocócico, ou ao mesmo tempo que uma vacina de influenza, ou ao mesmo tempo que uma vacina MMR ou MMRV. Estas vacinas serão geralmente administradas separadamente, mas durante a mesma visita do médico.

As infecções bacterianas podem afectar várias áreas do corpo e assim composições podem ser preparadas em várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injectáveis, como suspensões ou soluções líquidas. As formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em, veículos líquidos antes da injecção podem também ser preparadas (por exemplo, uma composição liofilizada). A composição pode ser preparada para administração tópica, por exemplo, como uma pomada, creme ou pó. A composição pode ser preparada para administração oral, por exemplo, como um comprimido ou cápsula, ou como um xarope (opcionalmente aromatizado). A composição pode ser preparada para administração pulmonar, por exemplo, como uma inalação, utilizando um pó fino ou um spray. A composição pode ser preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, aural ou ocular, por exemplo, como spray, gotas, gel ou pó [por exemplo, refs 79 & 80]. Em geral, no entanto, os conjugados meningocócicos são formulados para injecção intramuscular.

As composições utilizadas de acordo com a invenção podem ou podem não incluir um adjuvante de vacina. Os

adjuvantes que podem ser utilizados em composições da invenção incluem, mas não são limitados a:

A. *Composições que contêm minerais*

As composições que contêm minerais adequadas para utilização como adjuvantes na invenção incluem sais minerais, tais como sais de alumínio e sais de cálcio. A invenção inclui sais minerais tais como hidróxidos (por exemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por exemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por exemplo, veja-se capítulos 8 & 9 de ref. 81], ou misturas de compostos minerais diferentes, com os compostos tomando qualquer forma adequada (por exemplo, em gel, cristalina, amorfa, etc.), e com adsorção sendo preferida. As composições que contêm minerais podem também ser formuladas como uma partícula de sal de metal [82].

Fosfatos de alumínio são particularmente preferidos, e um adjuvante típico é hidroxifosfato de alumínio amorfo com  $\text{PO}_4/\text{Al}$  razão molar entre 0,84 e 0,92, incluídos em aproximadamente 0,6 mg de  $\text{Al}^{3+}/\text{ml}$ . A adsorção com uma dose baixa de fosfato de alumínio pode ser utilizada, por exemplo, entre 50 e 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{3+}$  por conjugado por dose. Onde uma composição inclui conjugados de múltiplas espécies bacterianas então não todos os conjugados necessitam ser adsorvidos.

B. *Emulsões de Óleo*

As composições de emulsão de óleo adequadas para utilização como adjuvantes na invenção incluem emulsões esqualeno-água, tais como MF59 [Capítulo 10 da ref. 81; veja-se também ref. 83] (5% de Esqualeno, 0,5% de Tween 80, e 0,5% de Span 85, formuladas em partículas submicrónicas utilizando um microfluidificador). O adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante incompleto de Freund (IFA) podem também ser utilizados.

C. *Formulações de saponina [capítulo 22 de ref. 81]*

As formulações de saponina podem também ser utilizadas como adjuvantes na invenção. As saponinas são um grupo heterólogo de glicósidos de esterol e glicósidos de triterpenóides que são encontrados na casca, folhas, caules, raízes e mesmo nas flores de uma ampla variedade de espécies de plantas. A saponina da casca da árvore *Quillaia saponaria* Molina foi amplamente estudada como adjuvantes. A saponina pode também ser comercialmente obtida de *Smilax ornata* (sarsaprilla), *Gypsophilla paniculata* (véu de noiva), e *Saponaria officianalis* (raiz de sabão). As formulações de adjuvante saponina incluem formulações purificadas, tais como QS21, bem como formulações de lípidos, tais como ISCOMs. QS21 é comercializado como Stimulon™.

As composições de saponina foram purificadas utilizando HPLC e RP-HPLC. As frações purificadas específicas utilizando estas técnicas foram identificadas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. Preferentemente, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é revelado na ref. 84. As formulações de saponina podem também compreender um esterol, tal como colesterol [85].

As combinações de saponinas e colesteróis podem ser utilizadas para formar partículas únicas denominadas complexos de imunoestimulação (ISCOMs) [capítulo 23 da ref. 81]. ISCOMs tipicamente também incluem um fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Qualquer saponina conhecida pode ser utilizada em ISCOMs. Preferentemente, o ISCOM inclui um ou mais de QuilA, QHA & QHC. ISCOMs são descritos ainda nas refs. 85-87. Opcionalmente, os ISCOMs podem ser desprovidos de detergente adicional [88].

Uma revisão do desenvolvimento de saponina à base de adjuvantes pode ser encontrada nas refs. 89 & 90.

D. *Virossomas e partículas semelhantes a vírus*

Virossomas e partículas semelhantes a vírus (VLPs) podem também ser utilizadas como adjuvantes na invenção. Estas estruturas geralmente contêm uma ou mais proteínas de um vírus opcionalmente combinado ou formulado com um fosfolípido. São geralmente não patogénicos, não replicam-se e geralmente não contêm qualquer do genoma viral. As proteínas virais podem ser recombinantemente produzidas ou isoladas de todos os vírus. Estas proteínas virais adequadas para utilização em virossomas ou VLPs incluem proteínas derivadas de influenza vírus (tais como HA ou NA), vírus da Hepatite B (tal como proteínas de core ou cápside), vírus da Hepatite E, vírus do sarampo, vírus Sindbis, Rotavírus, vírus da Doença de Pé-e-Boca, Retrovírus, vírus Norwalk, vírus do Papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q $\beta$  (tal como proteínas de revestimento), fago GA, fago fr, fago AP205, e Ty (tal como retrotransponson Ty proteína p1). VLPs são discutidos adicionalmente nas refs. 91-96. Os virossomas são discutidos adicionalmente, por exemplo, na ref. 97.

#### E. Derivados bacterianos ou microbianos

Adjuvantes adequados para utilização na invenção incluem derivados bacterianos ou microbianos tais como derivados não tóxicos de lipopolissacárido enterobacteriano (LPS), derivados de Lípido A, oligonucleótidos imunoestimuladores e toxinas de ribosilação de ADP e derivados destoxicificados dos mesmos.

Os derivados não tóxicos de LPS incluem lípido A monofosforilo (MPL) e 3-O-desacilado MPL (3dMPL). 3dMPL é uma mistura de lípido A 3 des-O-acilado monofosforilo com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Uma forma de "partícula pequena" preferida de lípido A monofosforilo 3 Des-O-acilado é revelada na ref. 98. Tais "partículas pequenas" de 3dMPL são pequenas o suficiente para serem esterilizadas por filtração através de uma membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  [98]. Outros derivados de LPS não tóxicos incluem miméticos de

lípido A monofosforilo, tais como derivados de aminoalquilo glucosaminida fosfato, por exemplo, RC-529 [99,100].

Os derivados de Lípido A incluem derivados de lípido A de *Escherichia coli* tal como OM-174. OM-174 é descrito, por exemplo, nas refs. 101 & 102.

Oligonucleótidos imunoestimuladores adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem sequências de nucleótidos que contêm um motivo CpG (uma sequência de dinucleótidos que contém uma citosina não metilada ligada por uma ligação de fosfato a uma guanosina). ARNs de cadeia dupla e oligonucleótidos que contêm sequências palindrómicas ou poli(dG) também mostraram que são imunoestimuladoras.

Os CpG's podem incluir modificações/análogos de nucleótidos tais como modificações de fosforotioato e podem ser de cadeia dupla ou de cadeia simples. As referências 103, 104 e 105 revelam substituições de análogos possíveis, por exemplo, a substituição de guanosina com 2'-desoxi-7-deazaguanosina. O efeito adjuvante de oligonucleótidos CpG é discutido ainda nas refs. 106-111.

A sequência de CpG pode ser direcionada a TLR9, tal como o motivo GTCGTT ou TTCTGG [112]. A sequência CpG pode ser específica para induzir uma resposta imune Th1, tal como um CpG-A ODN, ou pode ser mais específica para induzir uma resposta de célula B, tal CpG-B ODN. CpG-A e CpG-B ODNs são discutidos nas refs. 113-115. Preferentemente, o CpG é um CpG-A ODN.

Preferentemente, o oligonucleótilo CpG é construído de modo que a extremidade 5' seja acessível para o reconhecimento do receptor. Opcionalmente, duas sequências de oligonucleótidos CpG podem ser unidas nas suas extremidades 3' para formar "imunómeros". Veja-se, por exemplo, refs. 112 & 116-118.

As toxinas de ribosilação de ADP bacterianas e derivados destoxicificados das mesmas podem ser utilizados

como adjuvantes na invenção. Preferentemente, a proteína é derivada de *E. coli* (enterotoxina lábil por calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT"), ou pertussis ("PT"). A utilização de toxinas de ribosilação de ADP destoxificadas como adjuvantes de mucosa é descrita na ref. 119 e como adjuvantes parentéricos na ref. 120. A toxina ou toxóide é preferentemente na forma de um holotoxina, que compreende tanto a subunidade A como a B. Preferentemente, a subunidade A contém uma mutação de destoxificação; preferentemente a subunidade B não é mutada. Preferentemente, o adjuvante é um mutante de LT destoxificado tal como LT-K63, LT-R72, e LT-G192. A utilização de toxinas de ribosilação de ADP e derivados destoxificados das mesmas, particularmente LT-K63 e LT-R72, como adjuvantes podem ser encontrados nas refs. 121-128. A referência numérica para substituições de aminoácidos é preferentemente com base nos alinhamentos das subunidades A e B de toxinas de ribosilação de ADP indicadas na ref. 129.

#### *F. Imunomoduladores humanos*

Imunomoduladores humanos adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [130], etc.) [131], interferões (por exemplo, interferão-γ), factor de estimulação de colónias de macrófagos, e factor de necrose tumoral.

#### *G. Bioadesivos e Mucoadesivos*

Bioadesivos e mucoadesivos podem também ser utilizados como adjuvantes na invenção. Os bioadesivos adequados incluem microesferas de ácido hialurónico esterificadas [132] ou mucoadesivos tais como derivados de ligação cruzada de poli(ácido acrílico), polivinil álcool, polivinil pirrolidona, polissacáridos e carboximetilcelulose. Quitosano e derivados do mesmo podem também ser utilizados como adjuvantes na invenção [133].

#### *H Micropartículas*

As micropartículas podem também ser utilizadas como adjuvantes na invenção. As micropartículas (isto é, uma partícula de ~100 nm a ~150 µm em diâmetro, mais preferentemente ~200 nm a ~30 µm em diâmetro, e o mais preferente ~500 nm a ~10 µm em diâmetro) formadas a partir de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (por exemplo, um poli(ácido  $\alpha$ -hidroxi), um ácido polihidroxibutírico, um poliorthoéster, um polianidrido, um policaprolactona, etc.), com poli(lactida-co-glicólido) são preferidos, opcionalmente tratadas para ter uma superfície carregada negativamente (por exemplo, com SDS) ou uma superfície carregada positivamente (por exemplo, com um detergente catiónico, tal como CTAB).

#### *1. Lipossomas (Capítulos 13 & 14 da ref. 81)*

Os exemplos de formulações de lipossoma adequados para utilização como adjuvantes são descritos nas refs. 134-136.

#### *J. Formulações de éter de polioxietileno e éster de polioxietileno*

Os adjuvantes adequados para utilização na invenção incluem éteres de polioxietileno e ésteres de polioxietileno [137]. Tais formulações incluem ainda tensioactivos de éster de sorbitano de polioxietileno em combinação com um octoxinol [138] bem como tensioactivos de éster ou éteres de alquil polioxietileno em combinação com pelo menos um tensioactivo adicional não iónico tal como um octoxinol [139]. Os éteres de polioxietileno preferidos são seleccionados do seguinte grupo: éter de polioxietileno-9-laurilo (lauret 9), éter de polioxietileno-9-esteorilo, éter de polioxietileno-8-esteorilo, éter de polioxietileno-4-laurilo, éter de polioxietileno-35-laurilo, e éter de polioxietileno-23-laurilo.

#### *L. Péptidos de muramilo*

Exemplos de péptidos de muramilo adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-

normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), e N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

*K Polifosfazeno (PCPP)*

As formulações de PCPP são descritas, por exemplo, nas refs. 140 e 141.

*M. Compostos de Imidazoquinolona.*

Exemplos de compostos de imidazoquinolona adequados para utilização adjuvantes na invenção incluem Imiquamod e seus homólogos (por exemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente nas refs. 142 e 143.

*N. Compostos de tiosemicarbazona.*

Exemplos de compostos de tiosemicarbazona, bem como métodos de formulação, fabrico, e rastreio para todos os compostos adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem aqueles descritos na ref. 144. As tiosemicarbazonas são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares de sangue periférico humano para a produção de citocinas, tal como TNF- $\alpha$ .

*O. Compostos de triptantrina.*

Exemplos de compostos de triptantrina, bem como métodos de formulação, fabrico, e rastreio para todos os compostos adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem aqueles descritos na ref. 145. Os compostos de triptantrina são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares de sangue periférico humano para a produção de citocinas, tal como TNF- $\alpha$ .

A invenção pode também compreender combinações de aspectos de um ou mais dos adjuvantes identificados anteriormente. Por exemplo, as seguintes composições de adjuvante podem ser utilizado na invenção: (1) uma saponina e um emulsão de óleo-em-água [146]; (2) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado de LPS não tóxico (por exemplo, 3dMPL) [147]; (3) uma saponina (por exemplo, QS21)

+ um derivado de LPS não tóxico (por exemplo, 3dMPL) + um colesterol; (4) uma saponina (por exemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um esterol) [148]; (5) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões de óleo-emágua [149]; (6) SAF, que contém 10% de esqualeno, 0,4% de Tween 80™, 5% de polímero em bloco Pluronic L121, e thio-MDP, ou microfluidizado em um emulsão submicrónica ou submetido a vórtext para gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior. (7) sistema adjuvante Ribi™ (Ribi Immunochem) que contém 2% de esqualeno, 0,2% de Tween 80, e um ou mais componentes de parede celular bacteriana do grupo que consiste em monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM), e esqueleto de parede celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (8) um ou mais sais minerais (tal como um sal de alumínio) + um derivado não tóxico de LPS (tal como 3dMPL); e (9) um ou mais sais minerais (tal como um sal de alumínio) + um oligonucleótido imunoestimulante (tal como uma sequência de nucleótidos incluindo um motivo CpG).

Outras substâncias que agem como agentes imunoestimulantes são reveladas no capítulo 7 da ref. 81.

A utilização de um hidróxido de alumínio ou adjuvante de fosfato de alumínio é particularmente preferida, e conjugados são geralmente adsorvidos a estes sais [por exemplo, os exemplos 7 & 8 da ref. 9; exemplo J de ref. 10]. A mistura com sais de alumínio sem adsorção é também possível [27, 76]. Fosfato de cálcio é outro adjuvante preferido. Os conjugados podem ser misturados com (e opcionalmente adsorvidos a) os adjuvantes separadamente e então os conjugados podem ser misturados juntamente, ou os conjugados podem ser misturados juntamente e então misturados com adjuvante.

O pH das composições utilizadas de acordo com a invenção é preferentemente entre 6 e 8, preferentemente aproximadamente 7. O pH estável podem ser mantido por meio

da utilização de um tampão. Onde uma composição comprehende um hidróxido de sal de alumínio, prefere-se a utilização de um tampão de histidina [150]. A composição pode ser estéril e/ou livre de pirogénio. As composições podem ser isotónica com respeito a seres humanos.

As composições podem incluir um conservante (por exemplo, tiomersal, 2-fenoxietanol), ou podem ser livres de conservante. Composições preferidas da invenção não incluem qualquer material de mercúrio, por exemplo, são livres de tiomersal.

Para prevenir a interferência entre antigénios, particularmente antigénio conjugados, é possível incluir um polímero polianiónico, tal como ácido poli-L-glutámico [151].

As composições podem apresentar-se em frascos, ou podem apresentar-se em seringas pré-cheias. As seringas podem ser proporcionadas com ou sem agulhas. Uma seringa incluirá uma única dose da composição, enquanto um frasco podem incluir uma única dose ou doses múltiplas. Composições injectáveis usualmente serão soluções líquidas ou suspensões. Alternativamente, podem apresentar-se em forma sólida (por exemplo, liofilizada) para solução ou suspensão em veículos líquidos antes da injecção.

As composições podem ser embaladas em forma de dosagem unitária ou em forma de dosagem múltipla. Para as formas de dosagem múltipla, os frascos são preferidos a seringas pré-cheias. Volumes de dosagem eficazes podem ser estabelecidos rotineiramente, mas uma dose para seres humanos típica da composição para injecção tem um volume de 0,5 ml.

Onde uma composição é para ser preparado de maneira extemporânea antes da utilização (por exemplo, onde um componente apresenta-se em forma liofilizada) e apresenta-se como um kit, o kit pode compreender dois frascos, ou pode compreender um seringa pré-cheia e um frasco, com o conteúdo da seringa sendo utilizado para reactivar o

conteúdo do frasco antes de injecção. Para composições que incluem um sacárido capsular do sorogrupo A então o sacárido do sorogrupo A pode ser liofilizado, enquanto sacárido(s) dos outros sorogrupo(s) podem estar presentes em forma líquida.

As composições compreenderão uma quantidade imunologicamente eficaz dos conjugados meningocócicos, bem como quaisquer outros componentes, conforme seja necessário. Por 'quantidade imunologicamente eficaz', se quer dizer que a administração dessa quantidade a um indivíduo, numa única dose ou como parte de uma série, provoca um resposta imune anti-meningocócica protectora em pacientes. Esta quantidade varia dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, idade, o grupo taxonómico do indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata, etc.), a capacidade do sistema imune do indivíduo de sintetizar anticorpos, o grau de protecção desejado, a formulação da vacina, a avaliação do médico responsável da situação médica, e outros factores relevantes. É esperado que a quantidade esteja dentro de um intervalo relativamente grande que pode ser determinado através de ensaios de rotina, e um quantidade típica de cada antigénio meningocóccico por dose é entre 1  $\mu\text{g}$  e 20  $\mu\text{g}$  por sorogrupo (medido em termos de sacárido), por exemplo, entre 2 e 10  $\mu\text{g}$  por sorogrupo. Prefere-se uma dose de aproximadamente 4  $\mu\text{g}$  por sorogrupo (isto é, um total de 16  $\mu\text{g}$  numa mistura tetravalente).

A quantidade total de proteína portadora numa composição preferentemente não excede 100  $\mu\text{g}/\text{dose}$ , por exemplo, é <90  $\mu\text{g}/\text{dose}$ , <80  $\mu\text{g}/\text{dose}$ , <70  $\mu\text{g}/\text{dose}$ , <60  $\mu\text{g}/\text{dose}$ , <50  $\mu\text{g}/\text{dose}$ , etc. A quantidade total de proteína portadora numa composição geralmente será pelo menos 10  $\mu\text{g}/\text{dose}$ .

#### **Geral**

O termo "que compreende" abrange "que inclui" bem como "que consiste", por exemplo, uma composição "que compreende" X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir alguma coisa adicional, por exemplo, X + Y.

O termo "aproximadamente" em relação a um valor numérico x significa, por exemplo,  $x \pm 10\%$ .

A palavra "substancialmente" não exclui "completamente", por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre" de Y podem ser completamente livre de Y. Onde for necessário, a palavra "substancialmente" podem ser omitida da definição da invenção.

#### **MODOS PARA LEVAR A CABO A INVENÇÃO**

##### ***Falta de supressão de portador utilizando mistura de conjugado A/C/W135/Y tetravalente***

Misturas de conjugados meningocócicos para sorogrupos A+C, C+W+Y ou A+C+W+Y podem ser preparadas como foi descrito nas referências 9 e 10. Se for desejado, estes podem ser misturados com hidróxido de alumínio ou adjuvantes de fosfato de alumínio, como também foi descrito nas referências 9 e 10. Estas vacinas têm CRM197 ou toxóide de difteria (Dt) como a proteína portadora, ligada covalentemente aos sacáridos.

Pacientes que receberam vacinação D-T-P pediátrica (D-T-Pa ou D-T-Pw), incluindo aqueles que receberam vacinas que contêm D-T-P e outros抗igénios (por exemplo, D-T-P-Hib tetravalente, D-T-P-HBsAg tetravalente, D-T-P-Hib-HBsAg pentavalente, D-T-P-Hib-HBsAg-IPV hexavalente, etc.) são seleccionados para receber a mistura de conjugados que tem um portador Dt. Este mistura tetravalente de conjugados é imunogénica em seres humanos [9, 11, 13].

Pacientes que receberam vacinação de Hib pediátrica (como um Hib monovalente, com ou sem D-T-Pa ou D-T-Pw; ou como parte de uma combinação vacina tal como D-T-P-Hib tetravalente, D-T-P-Hib-HBsAg pentavalente, D-T-P-Hib-

HBsAg-IPV hexavalente, etc.) são seleccionados para receber a mistura de conjugados que tem um portador CRM197.

Um grupo controlo de pacientes é seleccionado para receber um das duas misturas de conjugado. Os pacientes de controlo não receberam previamente toxóide de difteria ou CRM197, como抗ígenos separados ou como proteínas portadoras em conjugados.

A capacidade dos conjugados tetravalentes para provocar uma resposta imune no pacientes é avaliada. A supressão de portador é indicada se os grupos de teste mostram respostas imunes anti-meningocócicas significativamente inferiores que os pacientes de controlo, e em particular se os conjugados falham para provocar um resposta de SBA útil no pacientes.

Em ensaio clínico V59P2, conduzido em Finlândia e Alemanha com 620 indivíduos com idade de 12-16 meses, cinco formulações foram testadas. As vacinas utilizaram portador CRM197 e um adjuvante de fosfato de alumínio [10]. Doses de cada sorogrupo sacárido, expressas como  $\mu\text{g}$  de massa de sacárido por 0,5 ml de dose, foram como segue:

<b>Grupo</b>	<b>MenA</b>	<b>MenC</b>	<b>MenW135</b>	<b>MenY</b>
1	10	10	10	10
2	0	10	10	10
3	10	5	5	5
4	5	5	5	5
5	2,5	2,5	2,5	2,5

Indivíduos receberam uma injecção no momento zero, e 25% dos indivíduos então receberam uma segunda dose da vacina 4 semanas mais tarde.

Os soros de pacientes foram colhidos 1 mês após administração da vacina e foram testados num ensaio de SBA contra *N. meningitidis* de cada sorogrupo, utilizando complemento humano. O aumento da titulação de SBA em relação a soros do tempo zero foi avaliado, com critérios

sendo >1:4 e >1:8, Titulações anti-cápsula (GMT) foram também medida para cada sorogrupo. Os resultados são mostrados no Quadro 1 a seguir.

Assim, as vacinas trivalente e tetravalente foram ambas imunogénica em crianças na fase de aprender a andar. Os conjugados são imunogénicos em doses de sacárido como baixas como 2,5 µg por conjugado. A resposta imune pode ser reforçada, com grandes aumentos de titulação de SBA após a segunda dose. Nenhuma evidência de supressão de portador foi visto neste ensaio.

#### **Falta de supressão de respostas anti-Dt**

Um estudo belga de 1999 [26] demonstrou imunidade contra tétanos debilitada em bebés, persistindo no início da infância, após o recebimento de um curso primário de vacina de Hib conjugada a toxóide de tétano. A proteína portadora do conjugado, portanto, teve um impacto imunológico negativo. Em contraste, o efeito oposto foi visto num estudo de vacinas de conjugado pneumocócico [152]. A possibilidade de que um conjugado meningocócico poderia interferir com a imunidade de difteria [153] foi estudada utilizando um conjugado de sacárido meningocócico do sorogrupo C a um portador CRM197 (Menjugate™).

Crianças foram divididas em cinco grupos, que foram imunizadas no primeiro ano de vida como segue: (1) quatro doses de Menjugate™; (2) três doses de Menjugate™, mais uma dose de uma mistura bivalente não conjugado A/C; (3) três doses de HBsAg vacina então uma dose de Menjugate™; (4) três doses de vacina HBsAg então uma dose de uma mistura bivalente não conjugado A/C; (5) controlos para receber vacinas não meningocócicas. Todas as crianças também receberam três doses de vacina de difteria durante os primeiros quatro meses de vida, mas não receberam um reforço contra difteria pré-escolar.

Pacientes receberam uma única dose de Menjugate™ a 4 anos de idade, e foram feitas amostras de sangue pré- e

pós- (~30 dias) esta injecção de Menjugate™. Os anticorpos contra difteria foram medidos por meio de ELISA e as concentrações médias geométricas foram avaliadas. A percentagem de indivíduos com um nível de anticorpo  $>0,1$  UI/ml foi também avaliada. Os resultados foram como segue:

Grupo	Pré-vacinação		Pós-vacinação	
	GMC	% $\geq 0,1$	GMC	% $\geq 0,1$
1	0,35	94%	9,00	100%
2	0,18	87%	8,55	100%
3	0,20	81%	2,82	100%
4	0,10	51%	4,55	99%

As titulações de avaliação inicial anti-Dt foram maiores em pacientes que previamente receberam Menjugate™ que naqueles que não (por exemplo, compare os grupos 1 e 4). A análise de regressão simples revelou relações lineares significativas entre o número de doses Menjugate™ prévias (4, 3, 1 e 0 para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente) e (a) titulações pré-vacinação anti-Dt e (b) titulações pós-vacinação anti-Dt.

Assim, existe uma persistência potenciada de imunidade para difteria a 4 anos de idade em crianças que receberam quatro doses de Menjugate™ na infância. Além disso, existe uma tendência para maiores respostas de anticorpo anti-Dt após um dose de reforço de Menjugate™ em pacientes que receberam pelo menos três doses de Menjugate™ como bebés. Nenhuma evidência de interferência imunológica entre conjugados meningocócicos e imunidade contra difteria foi encontrada.

***Mistura bivalente de conjugado A/C não mostra interferência com DTP***

Uma mistura de sacáridos capsulares dos sorogrupos A e C [8] foi administrada a bebés (5 a 11 semanas de idade) em Níger [154] que não receberam previamente vacina DTP. As crianças receberam ou sacáridos não conjugados (50 µg de cada sorogrupo) ou sacáridos conjugados com Dt sem adjuvante (4 µg de cada), com seis diferentes programas:

- (1) Quatro doses de conjugado: 6 semanas, 10 semanas, 14 semanas, 9 meses.

(2) Três doses de conjugado: 6 semanas, 10 semanas, 14 semanas.

(3) Duas doses de conjugado: 14 semanas, 9 meses.

(4) Uma dose de conjugado: 14 semanas.

(5) Uma dose de conjugado: 9 meses.

(6) uma dose de não conjugado: 9 meses.

As crianças receberam vacinas DTP e polio oral a 6, 10 e 14 semanas, com um reforço a 9 meses, e as vacinas meningocócicas foram administradas ao mesmo tempo como estas vacinas existentes. Para avaliar as respostas anamnésticas, foram também dadas as crianças uma vacina não conjugado a 24 meses.

As respostas de anticorpo bactericida sérico foram medidas a 18 semanas (isto é, 4 semanas após a terceira vacinação de DTP/polio), a 10 meses (isto é, 1 mês após o reforço do 9 mês de DTP/polio) e 1 semana após a administração de material não conjugado a 24 meses. As percentagens de pacientes mostrando um aumento  $\geq 128$  vezes em titulações de SBA foram como segue:

<b>%</b>	<b>18 semanas</b>		<b>10 meses</b>		<b>24<sup>1/4</sup> meses</b>	
	<b>MenA</b>	<b>MenC</b>	<b>MenA</b>	<b>MenC</b>	<b>MenA</b>	<b>MenC</b>
(1)	56	84	89	73	100	95
(2)	56	86	6	9	96	82
(3)	68	64	85	85	100	95
(4)	61	57	4	8	100	93
(5)	3	7	62	26	100	99
(6)	2	2	5	11	97	52

Não houve diferença em respostas de anticorpo contra toxóide de difteria entre os seis grupos [8].

Assim, não houve evidência de interferência resultando da utilização de toxóide de difteria tanto como um antigénio protector como como um portador para os conjugados. Por exemplo, pacientes no grupo 5 receberam

toxóide de difteria em vacinas de DTP a 6, 10 e 14 semanas antes de receber a primeira dose de conjugado meningocócico, mas mostraram uma resposta SBA anti-meningocócica de >99% a 24 meses.

**Nenhum impacto negativo sobre respostas anti-difteria**

Como mencionado anteriormente, pacientes que receberam vacinas de conjugado meningocócico ao mesmo tempo como vacinas DTP não mostraram redução em respostas imunes contra toxóide de difteria. Em outro estudo, conjugados meningocócicos e DTP foram administrados em momentos diferentes. Um programa de três doses de DTP a 2, 3 e 4 meses de idade foi seguida por uma única dose de uma vacina bivalente A/C com conjugados de Dt-sacáridos ou com sacáridos não conjugados. Respostas imunes contra toxóide de difteria foram medidos por meio de ELISA, e titulações GM foram como segue:

Antigénios	Pré-imunização	Pós-imunização
Conjugado	0,05	21,2
Não conjugado	0,06	0,06

Os sacáridos não conjugados não causaram qualquer resposta anti-Dt (não surpreendentemente), mas os sacáridos conjugados resultou numa forte resposta anti-DT. A administração destes conjugados podem assim proporcionar imunidade anti-difteria em pacientes naïve, ou podem tomar o lugar de um reforço de Dt.

Será compreendido que a invenção é descrita anteriormente por meio de exemplo somente e modificações podem ser feitas enquanto permanece dentro do âmbito da invenção, que é definidos nas reivindicações anexas.

**QUADRO 1- Resultados do ensaio V59P2**

<b>Grupo</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>W135</b>	<b>Y</b>
<b>GMT (1 mês após 1 dose)</b>				
<b>1</b>	3,9	6,4	7,1	8,9
<b>2</b>	2	6,1	8,3	8,5
<b>3</b>	5,7	5,2	6,9	12
<b>4</b>	3,8	4,5	7,0	9,6
<b>5</b>	3,9	5,3	7,0	12
<b>GMT (1 mês após 2 doses)</b>				
<b>1</b>	27	89	22	37
<b>2</b>	2	80	20	57
<b>3</b>	29	76	28	58
<b>4</b>	14	47	20	35
<b>5</b>	17	71	23	52
<b>% pacientes com SBA &gt;1:4 (1 mês após 1 dose)</b>				
<b>1</b>	33	56	57	58
<b>2</b>	0	57	60	61
<b>3</b>	55	49	53	70
<b>4</b>	37	42	54	64
<b>5</b>	40	51	57	67
<b>% pacientes com SBA ≥1:4 (1 mês após 2 doses)</b>				
<b>1</b>	100	100	96	96
<b>2</b>	0	100	73	92
<b>3</b>	91	96	95	95
<b>4</b>	84	96	88	96
<b>5</b>	80	100	80	92
<b>% pacientes com SBA ≥1:8 (1 mês após 1 dose)</b>				
<b>1</b>	25	44	46	48
<b>2</b>	0	40	50	49
<b>3</b>	39	34	45	64
<b>4</b>	23	30	44	51
<b>5</b>	26	35	40	60

(cont.)

<b>Grupo</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>W135</b>	<b>Y</b>
<b>% pacientes com SBA <math>\geq 1:8</math> (1 mês após 2 doses)</b>				
<b>1</b>	92	100	85	93
<b>2</b>	0	100	64	92
<b>3</b>	87	96	95	82
<b>4</b>	60	92	77	92
<b>5</b>	72	92	72	88

REFERÊNCIAS (o conteúdo das quais é incorporado pelo presente documento por referência)

- [1] Armand et al. (1982) J. Biol. Stand. 10:335-339.
- [2] Cadoz et al. (1985) Vacina 3:340-342.
- [3] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
- [4] Baklaic et al. (1983) Infect. Immun. 42:599-604.
- [5] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49.
- [6] Costantino et al. (1992) Vacina 10:691-8.
- [7] Lieberman et al. (1996) JAMA 275:1499-503.
- [8] documento WO2005/000345.
- [9] documento WO02/058737.
- [10] documento WO03/007985.
- [11] Rennels et al. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.
- [12] documento WO2004/013400.
- [13] Campbell et al. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.
- [14] Herzenberg et al. (1980) Nature 285: 664-667.
- [15] Schutze et al. (1985) J Immunol 135:2319-2322.
- [16] Dagan et al. (1998) Infect Immun 66:2093-2098.
- [17] Barington et al. (1994) Infect Immun 62:9-14.
- [18] Di John et al. (1989) Lancet 2(8677):1415-8.
- [19] Granoff et al. (1993) Vaccine Suppl: S46-51.
- [20] Granoff et al. (1994) JAMA 272:1116-1121.
- [21] Barington et al. (1993) Infect Immun 61:432-438.

Con formato: Español (España, internacional)

- [22] Patente australiana 748716 (concedida da documento WO98/51339).
- [23] Olander *et al.* (2001) Vaccine 20:336-341.
- [24] Burrage *et al.* (2002) Infect Immun 70:4946-4954.
- [25] Peeters *et al.* (1999) Infect Immun 59:3504-3510.
- [26] Hoppenbrouwers *et al.* (1999) Vacina 17:2588-98.
- [27] documento WO02/00249.
- [28] documento WO00/56360.
- [29] Reddin *et al.* (2001) FEMS Immunol Med Microbiol 31:153-162.
- [30] Podda *et al.* (1991) Vacina 9:741-745.
- [31] Darkes & Plosker (2002) Paediatr Drugs 4:609-630.
- [32] Vacinas. (eds. Plotkin & Orenstein). 4<sup>a</sup> edição, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [33] Del Guidice *et al.* (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
- [34] Anonymous (Jan de 2002) Research Disclosure, 453077.
- [35] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- [36] Anderson *et al.* (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- [37] Ramsay *et al.* (2001) Lancet 357(9251):195-196.
- [38] Lindberg (1999) Vacina 17 Suppl 2:S28-36.
- [39] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168.
- [40] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-33, viii.
- [41] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.
- [42] Patente europeia 0477508.
- [43] Patente US 5.306.492.
- [44] documento WO98/42721.
- [45] Dick *et al.* em Conjugate Vaccines (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [46] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [47] documento WO03/080678.
- [48] Glode *et al.* (1979) J Infect Dis 139:52-56

**Con formato:** Español (España, internacional)

- [49] documento WO94/05325; Patente US 5.425.946.
- [50] Pedido de patente do Reino Unido 0323103,2.
- [51] documento WO99/42130
- [52] documento WO96/40242
- [53] Lees *et al.* (1996) Vacina 14:190-198.
- [54] documento WO95/08348.
- [55] Patente US 4.882.317
- [56] Patente US 4.695.624
- [57] Porro *et al.* (1985) Mol Immunol 22:907-919.
- [58] EP-Um-0208375
- [59] documento WO00/10599
- [60] Gever *et um*. Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- [61] Patente US 4.057.685.
- [62] Patente USs 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [63] Patente US 4.459.286.
- [64] Patente US 4.965.338
- [65] Patente US 4.663.160.
- [66] Patente US 4.761.283
- [67] Patente US 4.356.170
- [68] Balmer & Borrow (2004) Expert Rev Vaccines 3:77-87.
- [69] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
- [70] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.
- [71] Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
- [72] Zielen *et al.* (2000) Infect. Immun. 68:1435-1440.
- [73] Kanra *et al.* (1999) The Turkish Journal of Paediatrics 42:421-427.
- [74] Ravenscroft *et al.* (2000) Dev Biol (Basel) 103: 35-47.
- [75] documento WO97/00697.
- [76] documento WO96/37222; Patente US 6.333.036.
- [77] documento WO2004/032958
- [78] Gennaro (2000) Remington: The Science of Practice of Pharmacy. 20<sup>a</sup> ed. ISBN: 0683306472.
- [79] Almeida & Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.

**Con formato:** Español (España, internacional)

**Con formato:** Español (España, internacional)

**Con formato:** Español (España, internacional)

- [80] Agarwal & Mishra (1999) Indian J Exp Biol 37:6-16.
- [81] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [82] documento WO00/23105.
- [83] documento WO90/14837.
- [84] Patente US 5.057.540.
- [85] documento WO96/33739.
- [86] documento EP-A-0109942.
- [87] documento WO96/11711.
- [88] documento WO00/07621.
- [89] Barr et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [90] Sjolanderet et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- [91] Niikura et al. (2002) Virology 293:273-280.
- [92] Lenz et al. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
- [93] Pinto et al. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
- [94] Gerber et al. (2001) Virol 75:4752-4760.
- [95] documento WO03/024480
- [96] documento WO03/024481
- [97] Gluck et al. (2002) Vacina 20:B10-B16.
- [98] documento EP-A-0689454.
- [99] Johnson et al. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [100] Evans et al. (2003) Expert Rev Vacinas 2:219-229.
- [101] Meraldi et al. (2003) Vacina 21:2485-2491.
- [102] Pajak et al. (2003) Vacina 21:836-842.
- [103] Kandimalla et al. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.
- [104] documento WO02/26757.
- [105] documento WO99/62923.
- [106] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
- [107] McCluskie et al. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.
- [108] documento WO98/40100.

- [109] Patente US 6.207.646.
- [110] Patente US 6.239.116.
- [111] Patente US 6.429.199.
- [112] Kandimalla *et al.* (2003) Biochemical Society Transacções 31 (parte 3):654-658.
- [113] Blackwell *et al.* (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- [114] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
- [115] documento WO01/95935.
- [116] Kandimalla *et al.* (2003) BBRC 306:948-953.
- [117] Bhagat *et al.* (2003) BBRC 300:853-861.
- [118] documento WO03/035836.
- [119] documento WO95/17211.
- [120] documento WO98/42375.
- [121] Beignon *et al.* (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
- [122] Pizza *et al.* (2001) Vacina 19:2534-2541.
- [123] Pizza *et al.* (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- [124] Scharton-Kersten *et al.* (2000) Infect Immun 68:5306-5313.
- [125] Ryan *et al.* (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
- [126] Partidos *et al.* (1999) Immunol Lett 67:209-216.
- [127] Peppoloni *et al.* (2003) Expert Rev Vacinas 2:285-293.
- [128] Pine *et al.* (2002) J Control Release 85:263-270.
- [129] Domenighini *et al.* (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
- [130] documento WO99/40936.
- [131] documento WO99/44636.
- [132] Singh *et al.* (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [133] documento WO99/27960.
- [134] Patente US 6.090.406
- [135] Patente US 5.916.588
- [136] documento EP-A-0626169.
- [137] documento WO99/52549.
- [138] documento WO01/21207.

- [139] documento WO01/21152.
- [140] Andrianov *et al.* (1998) Biomaterials 19:109–115.
- [141] Payne *et al.* (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185–196.
- [142] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571–577.
- [143] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214–218.
- [144] documento WO04/60308
- [145] documento WO04/64759.
- [146] documento WO99/11241.
- [147] documento WO94/00153.
- [148] documento WO98/57659.
- [149] Pedidos de patente europeia 0835318, 0735898 e 0761231.
- [150] documento WO03/009869.
- [151] documento WO2004/110480.
- [152] Olander *et al.* (2002) Vaccine 20:336–41.
- [153] Mc Vernon *et al.* (2003) Vaccine 21:2573–9.
- [154] Chippaux *et al.* (2004) Vaccine 22:3303–11.

**DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

**Documentos de patente referidos na descrição**

- WO 03094834 A [0017]
- WO 2005000345 A [0131]
- WO 02058737 A [0131]
- WO 03007985 A [0131]
- WO 2004013400 A [0131]
- AU 748716 [0131]
- WO 9851339 A [0131]
- WO 0200249 A [0131]
- WO 0056360 A [0131]
- EP 0477508 A [0131]
- US 5306492 A [0131]
- WO 9842721 A [0131]
- WO 03080678 A [0131]
- WO 9405325 A [0131]
- US 5425946 A [0131]
- GB 0323103 A [0131]
- WO 9942130 A [0131]
- WO 9640242 A [0131]
- WO 9508348 A [0131]
- US 4882317 A [0131]
- US 4695624 A [0131]
- EP 0208375 A [0131]
- WO 0010599 A [0131]
- US 4057685 A [0131]
- US 4673574 A [0131]
- US 4761283 A [0131]

- US 4808700 A [0131]
- US 4459286 A [0131]
- US 4965338 A [0131]
- US 4663160 A [0131]
- US 4356170 A [0131]
- WO 9700697 A [0131]
- WO 9637222 A [0131]
- US 6333036 B [0131]
- WO 2004032958 A [0131]
- WO 0023105 A [0131]
- WO 9014837 A [0131]
- US 5057540 A [0131]
- WO 9633739 A [0131]
- EP 0109942 A [0131]
- WO 9611711 A [0131]
- WO 0007621 A [0131]
- WO 03024480 A [0131]
- WO 03024481 A [0131]
- EP 0689454 A [0131]
- WO 0226757 A [0131]
- WO 9962923 A [0131]
- WO 9840100 A [0131]
- US 6207646 B [0131]
- US 6239116 B [0131]
- US 6429199 B [0131]
- WO 0195935 A [0131]
- WO 03035836 A [0131]
- WO 9517211 A [0131]
- WO 9842375 A [0131]
- WO 9940936 A [0131]
- WO 9944636 A [0131]
- WO 9927960 A [0131]
- US 6090406 A [0131]
- US 5916588 A [0131]
- EP 0626169 A [0131]

- WO 9952549 A [0131]
- WO 0121207 A [0131]
- WO 0121152 A [0131]
- WO 0460308 A [0131]
- WO 0464759 A [0131]
- WO 9911241 A [0131]
- WO 9400153 A [0131]
- WO 9857659 A [0131]
- EP 0835318 A [0131]
- EP 0735898 A [0131]
- EP 0761231 A [0131]
- WO 03009869 A [0131]
- WO 2004110480 A [0131]

**Literatura não relacionada com patentes referida na descrição**

- **Armand et al.** J. Biol. Stand., 1982, vol. 10, 335–339 [0131]
- **Cadoz et al.** Vaccine, 1985, vol. 3, 340–342 [0131]
- MMWR, 1997, vol. 46 (RR-5), 1–10 [0131]
- **Baklaic et al.** Infect. Immun., 1983, vol. 42, 599–604 [0131]
- **Jones.** Curr Opin Investig Drugs, 2001, vol. 2, 47–49 [0131]
- **Costantino et al.** Vaccine, 1992, vol. 10, 691–8 [0131]
- **Lieberman et al.** JAMA, 1996, vol. 275, 1499–503 [0131]
- **Rennels et al.** Pediatr Infect Dis J, 2002, vol. 21, 978–979 [0131]
- **Campbell et al.** J Infect Dis, 2002, vol. 186, 1848–1851 [0131]
- **Herzenberg et al.** Nature, 1980, vol. 285, 664–667 [0131]
- **Schutze et al.** J Immunol, 1985, vol. 135, 2319–2322 [0131]
- **Dagan et al.** Infect Immun, 1998, vol. 66, 2093–2098 [0131]

- **Barington et al.** Infect Immun, 1994, vol. 62, 9-14 [0131]
- **Di John et al.** Lancet, 1989, vol. 2 (8677), 1415-8 [0131]
- **Granoff et al.** Vaccine, 1993, vol. 1, 46-51 [0131]
- **Granoff et al.** JAMA, 1994, vol. 272, 1116-1121 [0131]
- **Barington et al.** Infect Immun, 1993, vol. 61, 432-438 [0131]
- **Olander et al.** Vaccine, 2001, vol. 20, 336-341 [0131]
- **Burrage et al.** Infect Immun, 2002, vol. 70, 4946-4954 [0131]
- **Peeters et al.** Infect Immun, 1999, vol. 59, 3504-3510 [0131]
- **Hoppenbrouwers et al.** Vaccine, 1999, vol. 17, 2588-98 [0131]
- **Reddin et al.** FEMS Immunol Med Microbiol, 2001, vol. 31, 153-162 [0131]
- **Podda et al.** Vaccine, 1991, vol. 9, 741-745 [0131]
- **Darkes ; Plosker.** Paediatr Drugs, 2002, vol. 4, 609-630 [0131]
- Vaccines. 2004 [0131]
- **Del Guidice et al.** Molecular Aspects of Medicine, 1998, vol. 19, 1-70 [0131]
- **Anonymous.** Research Disclosure, January 2002, 453077 [0131]
- **Anderson.** Infect Immun, 1983, vol. 39 (1), 233-238 [0131]
- **Anderson et al.** J Clin Invest, 1985, vol. 76 (1), 52-59 [0131]
- **Ramsay et al.** Lancet, 2001, vol. 357 (9251), 195-196 [0131]
- **Lindberg.** Vaccine, 1999, vol. 17 (2), 28-36 [0131]
- **Buttery ; Moxon.** J R Coll Physicians Lond, 2000, vol. 34, 163-168 [0131]

- **Ahmad ; Chapnick.** Infect Dis Clin North Am, 1999, vol. 13, 113-33vii [0131]
- **Goldblatt.** J. Med. Microbiol., 1998, vol. 47, 563-567 [0131]
- **Dick et al.** Conjugate Vaccines. Karger, 1989, vol. 10, 48-114 [0131]
- **Hermanson.** Bioconjugate Techniques. Academic Press, 1996 [0131]
- **Glode et al.** J Infect Dis, 1979, vol. 139, 52-56 [0131]
- **Lees et al.** Vaccine, 1996, vol. 14, 190-198 [0131]
- **Porro et al.** Mol Immunol, 1985, vol. 22, 907-919 [0131]
- **Gever.** Med. Microbiol. Immunol, 1979, vol. 165, 171-288 [0131]
- **Balmer ; Borrow.** Expert Rev Vaccines, 2004, vol. 3, 77-87 [0131]
- **Watson.** Pediatr Infect Dis J, 2000, vol. 19, 331-332 [0131]
- **Rubin.** Pediatr Clin North Am, 2000, vol. 47, 269-285 [0131]
- **Jedrzejas.** Microbiol Mol Biol Rev, 2001, vol. 65, 187-207 [0131]
- **Zielen et al.** Infect. Immun., 2000, vol. 68, 1435-1440 [0131]
- **Kanra et al.** The Turkish Journal of Paediatrics, 1999, vol. 42, 421-427 [0131]
- **Ravenscroft et al.** Dev Biol (Basel), 2000, vol. 103, 35-47 [0131]
- **Gennaro.** Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 2000 [0131]
- **Almeida ; Alpar.** J. Drug Targeting, 1996, vol. 3, 455-467 [0131]
- **Agarwal; Mishra.** Indian J Exp Biol, 1999, vol. 37, 6-16 [0131]
- Vaccine Design... Plenum, 1995 [0131]

- **Barr et al.** Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, vol. 32, 247–271 [0131]
- **Sjolanderet et al.** Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, vol. 32, 321–338 [0131]
- **Niikura et al.** Virology, 2002, vol. 293, 273–280 [0131]
- **Lenz et al.** J Immunol, 2001, vol. 166, 5346–5355 [0131]
- **Pinto et al.** J Infect Dis, 2003, vol. 188, 327–338 [0131]
- **Gerber et al.** Virol, 2001, vol. 75, 4752–4760 [0131]
- **Gluck et al.** Vaccine, 2002, vol. 20, B10–B16 [0131]
- **Johnson et al.** Bioorg Med Chem Lett, 1999, vol. 9, 2273–2278 [0131]
- **Evans et al.** Expert Rev Vaccines, 2003, vol. 2, 219–229 [0131]
- **Meraldi et al.** Vaccine, 2003, vol. 21, 2485–2491 [0131]
- **Pajak et al.** Vaccine, 2003, vol. 21, 836–842 [0131]
- **Kandimalla et al.** Nucleic Acids Research, 2003, vol. 31, 2393–2400 [0131]
- **Krieg.** Nature Medicine, 2003, vol. 9, 831–835 [0131]
- **McCluskie et al.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2002, vol. 32, 179–185 [0131]
- **Kandimalla et al.** Biochemical Society Transactions, 2003, vol. 31 (3), 654–658 [0131]
- **Blackwell et al.** J Immunol, 2003, vol. 170, 4061–4068 [0131]
- **Krieg.** Trends Immunol, 2002, vol. 23, 64–65 [0131]
- **Kandimalla et al.** BBRC, 2003, vol. 306, 948–953 [0131]
- **Bhagat et al.** BBRC, 2003, vol. 300, 853–861 [0131]
- **Beignon et al.** Infect Immun, 2002, vol. 70, 3012–3019 [0131]
- **Pizza et al.** Vaccine, 2001, vol. 19, 2534–2541 [0131]
- **Pizza et al.** Int J Med Microbiol, 2000, vol. 290, 455–461 [0131]
- **Scharton-Kersten et al.** Infect Immun, 2000, vol. 68, 5306–5313 [0131]

- **Ryan et al.** Infect Immun, 1999, vol. 67, 6270–6280 [0131]
- **Partidos et al.** Immunol Lett, 1999, vol. 67, 209–216 [0131]
- **Peppoloni et al.** Expert Rev Vaccines, 2003, vol. 2, 285–293 [0131]
- **Pine et al.** J Control Release, 2002, vol. 85, 263–270 [0131]
- **Domenighini et al.** Mol Microbiol, 1995, vol. 15, 1165–1167 [0131]
- **Singh et al.** J Cont Release, 2001, vol. 70, 267–276 [0131]
- **Andrianov et al.** Biomaterials, 1998, vol. 19, 109–115 [0131]
- **Payne et al.** Adv Drug Delivery Review, 1998, vol. 31, 185–196 [0131]
- **Stanley.** Clin Exp Dermatol, 2002, vol. 27, 571–577 [0131]
- **Jones.** Curr Opin Investig Drugs, 2003, vol. 4, 214–218 [0131]
- **Olander et al.** Vaccine, 2002, vol. 20, 336–41 [0131]
- **Mc Vernon et al.** Vaccine, 2003, vol. 21, 2573–9 [0131]
- **Chippaux et al.** Vaccine, 2004, vol. 22, 3303–11 [0131]

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Uma composição que compreende: (a) um conjugado de (i) sacárido capsular do sorogrupo A de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria; (b) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo C de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria; (c) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo W135 de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria; e (d) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo Y de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria, para utilização num método para imunizar um paciente humano contra uma doença causada por *Neisseria meningitidis* que compreende a etapa em que se administra ao paciente humano a composição, em que o paciente foi pré-imunizado com (a) um toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria e/ou (b) um conjugado de (i) um sacárido capsular de um organismo diferente de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria.
2. Uma composição de acordo com a reivindicação 1 para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a composição compreende: (a) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo A de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria; (b) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo C de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide da

difteria; (c) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo W135 de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide da difteria; e (d) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo Y de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide da difteria, e em que o paciente foi pré-imunizado com (a) um toxóide da difteria e/ou (b) um conjugado de (i) um sacárido capsular de um organismo diferente de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide da difteria ou CRM197.

3. Uma composição de acordo com a reivindicação 1 para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a composição compreende: (a) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo A de *N. meningitidis* e (ii) CRM197; (b) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo C de *N. meningitidis* e (ii) CRM197; (c) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo W135 de *N. meningitidis* e (ii) CRM197; e (d) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo Y de *N. meningitidis* e (ii) CRM197, e em que o paciente foi pré-imunizado com um conjugado de (i) um sacárido capsular de um organismo diferente de *N. meningitidis* e (ii) CRM197 ou um toxóide da difteria.

4. A utilização de: (a) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo A de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria; (b) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo C de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria; (c) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo W135 de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria ou derivado do mesmo que permanece reactivo imunologicamente de forma cruzada com toxóide da difteria; e (d) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo Y de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria

ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria, no fabrico de um medicamento para imunizar um paciente humano contra uma doença causada por *Neisseria meningitidis*, em que o paciente foi pré-imunizado com (a) um toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria e/ou (b) um conjugado de (i) sacárido capsular de um organismo diferente de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide da difteria ou seu derivado que permanece imunologicamente reactivo de forma cruzada com toxóide da difteria.

5. A utilização de acordo com a reivindicação 4, em que a utilização é de: (a) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo A de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria; (b) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo C de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria; (c) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo W135 de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria; e (d) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo Y de *N. meningitidis* e (ii) toxóide da difteria, e em que o paciente foi pré-imunizado com (a) um toxóide da difteria e/ou (b) um conjugado de (i) um sacárido capsular de um organismo diferente de *N. meningitidis* e (ii) um toxóide da difteria ou CRM197.

6. A utilização de acordo com a reivindicação 4, em que a utilização é de: (a) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo A de *N. meningitidis* e (ii) CRM197; (b) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo C de *N. meningitidis* e (ii) CRM197; (c) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo W135 de *N. meningitidis* e (ii) CRM197; e (d) um conjugado de (i) sacárido capsular de sorogrupo Y de *N. meningitidis* e (ii) CRM197, e em que o paciente foi pré-imunizado com um conjugado de (i) um

sacárido capsular de um organismo diferente de *N. meningitidis* e (ii) CRM197 ou um toxóide da difteria.

7. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, em que os conjugados são misturados para dar um razão 1:1:1:1 ou 2:1:1:1 (medido como massa de sacárido).

8. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 7, em que cada抗igénio meningocócico por dose se encontra compreendido entre 2 e 10 µg por sorogrupo (medido em termos de sacárido).

9. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 8 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8, em que o paciente foi pré-imunizado com uma vacina que compreende um toxóide da difteria.

10. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 9 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 9, em que o paciente foi pré-imunizado com uma vacina que compreende um conjugado Hib.

11. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 10 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 10, em que o paciente foi pré-

imunizado com uma vacina que compreende pelo menos um conjugado pneumocócico.

12. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 11 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 11, em que o paciente foi pré-imunizado pelo menos seis meses antes do método ou utilização.

13. A composição de acordo com a reivindicação 12 para a utilização de acordo com a reivindicação 12, ou a utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o paciente foi pré-imunizado pelo menos 8 anos antes do método ou utilização.

14. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 13 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 13, em que a pré-imunização ocorre no espaço de 1 ano após o nascimento do paciente.

15. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 14 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 14, em que os sacáridos nos conjugados meningocócicos (a) a (d) foram despolimerizados de modo que são mais curtos que os sacáridos capsulares nativos que ocorrem em meningococos.

16. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 15 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 15, em que os conjugados

meningocócicos compreendem toxóide da difteria como proteína transportadora e um *linker* de ácido adípico.

17. A composição de acordo com a reivindicação 16 para a utilização de acordo com a reivindicação 16, ou a utilização de acordo com a reivindicação 16, que compreende não mais do que 60 µg de toxóide da difteria como proteína transportadora.

18. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 17 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 17, em que a composição ou o medicamento compreende ainda um sacárido capsular conjugado de *Streptococcus pneumoniae*.

19. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 18 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 18, em que a composição ou o medicamento compreende ainda um sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo B.

20. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 19 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 19, em que a composição ou o medicamento compreende ainda um antigénio proteico do sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

21. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 20 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 20, em que a composição ou o

medicamento inclui um adjuvante de hidróxido de alumínio e/ou um adjuvante de fosfato de alumínio.

22. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 7 a 21 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 21, em que a doença causada por *Neisseria meningitidis* é meningite meningocócica.

23. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para a utilização dessa reivindicação, ou a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, em que:

- o paciente foi pré-imunizado, pelo menos cinco anos antes do método ou utilização, com uma vacina que compreende um toxóide da difteria;
- os conjugados meningocócicos compreendem toxóide da difteria como proteína transportadora e, opcionalmente, um linker de ácido adípico;
- os conjugados meningocócicos estão presentes numa concentração de 8 µg/ml (medida como sacárido meningocócico) por sorogrupo;
- a razão de peso sacárido:proteína transportadora para cada conjugado é 1:3;
- a composição ou o medicamento inclui 96 µg/ml de toxóide da difteria;
- a composição ou o medicamento inclui 1,2 mg/ml de fosfato de sódio; e
- a composição ou o medicamento inclui 8,8 mg/ml de cloreto de sódio.