

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

(21) **PI0614254-0 A2**

(22) Data de Depósito: 02/08/2006
(43) Data da Publicação: 15/03/2011
(RPI 2097)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/39
A61K 39/29

(54) Título: **REDUÇÃO DE INTERFERÊNCIA ENTRE ADJUVANTES CONTENDO ÓLEO E ANTÍGENOS CONTENDO TENSOATIVOS**

(30) Prioridade Unionista: 02/08/2005 GB 0515906.6,
04/11/2005 GB 0522599.0, 24/11/2005 GB 0523923.1

(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS SRL

(72) Inventor(es): MARIO CONTORNI

(74) Procurador(es): FLÁVIA SALIM LOPES

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006002581 de 02/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/015167 de 08/02/2007

(57) Resumo: REDUÇÃO DE INTERFERÊNCIA ENTRE ADJUVANTES CONTENDO ÓLEO E ANTÍGENOS CONTENDO TENSOATIVOS. A inclusão de adjuvantes graxos em composições de vacina pode causar dificuldades com certos componentes antiqênicos, particularmente com antígenos que incluem um componente tensoativo. Um método para a preparação de uma composição imunogênica que compreende um antígeno e um adjuvante graxo envolve a purificação do antígeno substancialmente na ausência de tensoativo. Quando tensoativos não podem ser evitados, os seguintes são combinados: (i) um componente antígeno que inclui um tensoativo e (ii) um componente adjuvante graxo, para gerar uma composição em que a proporção de peso entre o referido adjuvante graxo e o referido tensoativo é menor que 1.000:1.

REDUÇÃO DE INTERFERÊNCIA ENTRE ADJUVANTES CONTENDO ÓLEO E ANTÍGENOS CONTENDO TENSOATIVOS

Todos os documentos aqui citados são aqui incorporados em sua totalidade por referência.

5 Campo técnico

Esta invenção está no campo de fabricação de vacinas com adjuvantes. Em particular, ela diz respeito ao uso de adjuvantes graxos durante a fabricação de vacinas baseadas em antígenos que contêm tensoativos.

10 Técnica de fundamento

O uso de adjuvantes para melhorar as respostas imunes contra antígenos de vacina é bem conhecido (por exemplo, veja, as referências 1 e 2). Por vários anos os únicos adjuvantes aprovados para uso humano eram sais de alumínio, mas vacinas contendo o adjuvante MF59 e o adjuvante RC-529 foram aprovadas em vários países, que incluem Itália (no produto FLUADTM de Chiron) e Argentina (no produto SUPERVAXTM de Berna Biotech). Adjuvantes adicionais em último estágio de uso experimental humano incluem misturas de colesterol e saponinas, ISCOMs, MPLTM, ASO4, virossomos, SBA4 etc.

Uma característica comum de algumas alternativas aos sais de alumínio é a presença de um componente graxo. Por exemplo, o adjuvante MF59 inclui esqualeno (um óleo), e MPLTM contém uma forma desacilada de monofosforil lipídeo A que tem múltiplas cadeias de ácidos graxos anexadas a uma estrutura de di-glicosamina.

A invenção visa evitar a interferência que pode ocorrer entre esses adjuvantes graxos e antígenos que incluem um componente tensoativo.

Sumário da invenção

O inventor constatou que adjuvantes graxos em composições de vacina podem ser incompatíveis com antígenos que incluem um componente tensoativo. Em várias situações, 5 no entanto, permanece desejável combinar um adjuvante graxo e uma mistura antígeno/tensoativo, e é um objetivo da invenção fornecer vias de evitar as dificuldades que podem surgir ao fazê-lo. É também um objetivo fornecer processos para combinar adjuvantes e antígenos, em que a 10 incompatibilidade é evitada.

Para evitar esses problemas de incompatibilidade quando do uso de antígenos que são tipicamente purificados pelo uso de tensoativos, um primeiro aspecto da invenção fornece um processo para a preparação de uma composição 15 imunogênica, em que: (a) a composição compreende um antígeno e um adjuvante graxo; e (b) o antígeno é purificado substancialmente na ausência de tensoativo. Ao purificar o antígeno por uma via alternativa que evita o uso de tensoativo, qualquer incompatibilidade com 20 adjuvantes graxos pode ser superada.

Por razões clínicas, históricas ou reguladoras, no entanto, pode não ser possível purificar um antígeno sem o uso de tensoativos, ou remover totalmente tensoativos das vacinas. Nessa situação, a invenção evita interferência por 25 redução da proporção de óleo para o tensoativo na composição. Uma vacina de MF59/HBsAg típica contém um grande excesso de óleo em relação ao tensoativo, com uma proporção de óleo:tensoativo de mais que 4.000:1 (em peso). A invenção deseja minimizar a quantidade de adjuvante graxo 30 na composição e, em um segundo aspecto, a invenção usa no

máximo um excesso de peso de óleo de 1.000 vezes. Portanto, a invenção fornece um processo para a preparação de uma composição imunogênica, que compreende as etapas de combinação de (i) um componente antígeno que inclui um
5 tensoativo e (ii) um componente adjuvante graxo, para gerar uma composição em que a proporção de peso do adjuvante graxo para o tensoativo é menor que 1.000:1. De modo similar, a invenção fornece uma composição imunogênica, em que: (a) a composição compreende um componente antígeno e
10 um componente adjuvante graxo; (b) o componente antígeno inclui um tensoativo; e (c) a proporção de peso do adjuvante graxo para o tensoativo é menor que 1.000:1.

O adjuvante graxo

O primeiro e segundo aspectos da invenção utilizam um
15 adjuvante graxo, ou seja, um componente adjuvante que inclui uma molécula graxa. Adjuvantes graxos típicos compreendem um óleo metabolizável, um ácido graxo e/ou uma molécula que compreende uma porção de ácido graxo.

Dois adjuvantes graxos preferidos são os adjuvantes
20 conhecidos como "MF59" e "MPL". "MF59" é um adjuvante graxo porque ele contém esqualeno, que é um óleo metabolizável. "MPL" é um adjuvante graxo porque ele contém um dissacarídeo substituído com múltiplas cadeias de ácido graxo. Bem como MF59, outros adjuvantes de emulsão óleo em
25 água também podem ser usados.

Portanto, composições preferidas da invenção incluem:
(a) uma emulsão óleo em água, como uma emulsão óleo em água submicrométrica que compreende esqualeno e monooleato de polioxietileno sorbitano (e, opcionalmente, trioleato de
30 sorbitano); e/ou (b) um monofosforil lipídeo A 3-O-

desacilado. Monooleato de polioxietileno sorbitano é também conhecido como polysorbato 80.

Em adição a "MF59" e "MPL", outros adjuvantes graxos que podem ser usados com a invenção incluem, mas não são limitados a: derivados de fosfato de glicosaminídeo; N-acil-pseudodipeptídeos; o adjuvante solúvel derivado do lipídeo A de *Escherichia coli* conhecido como "OM-174"; compostos que contêm lipídeos ligados a uma estrutura acíclica que contém fosfato; e análogos de lipídeo A sintético acíclico.

Quando um adjuvante de emulsão óleo em água como MF59 é usado, ele é tipicamente adicionado a um volume igual de uma composição aquosa de antígeno, de modo que a emulsão é 50% em volume da composição total. Quando um adjuvante 3D-MPL é usado, uma dose típica está entre 25 µg/ml e 200 µg/ml por exemplo na faixa de 50-150 µg/ml, 75-125 µg/ml, 90-110 µg/ml, ou cerca de 100 µg/ml. É comum administrar entre 25-75 µg de 3D-MPL por dose por exemplo entre 45-55 µg, ou cerca de 50 µg de 3D-MPL por dose. Um adjuvante de emulsão como MF59 será tipicamente fornecido em um recipiente separado do antígeno, para mistura extemporânea no momento do uso, ou ele pode ser fornecido já misturado com o antígeno. Um adjuvante de 3D-MPL será tipicamente já misturado com o antígeno antes da distribuição ao usuário final.

MF59

O adjuvante "MF59" é uma emulsão óleo em água formada a partir de esqualeno, Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano) e Span 85 (trioleato de sorbitano). A emulsão é microfluidificada para gerar uma

emulsão com um tamanho de gotícula submicrométrica. A preparação de MF59 foi originalmente descrita na referência 3, e o produto foi fabricado e vendido pela "Chiron Corporation". Detalhes adicionais podem ser encontrados no
5 capítulo 10 da ref. 2, capítulo 12 da ref. 1 e nas referências 4 a 6. A composição de MF59 em volume é 5% esqualeno, 0,5% polisorbato 80 e 0,5% Span 85. Em termos de peso, essas proporções se tornam 4,3% de esqualeno, 0,5% de polisorbato 80 e 0,48% de Span 85. O conteúdo de tensoativo
10 próprio de MF59 não é levado em consideração quando do cálculo da proporção óleo:tensoativo no segundo aspecto da invenção, uma vez que a proporção é baseada no conteúdo de tensoativo do antígeno.

A emulsão de MF59 inclui vantajosamente íons de
15 citrato, por exemplo, 10 mM de tampão de citrato de sódio.
Outras emulsões óleo em água

Como uma alternativa ao adjuvante MF59, outras emulsões óleo em água podem ser usadas. Emulsões de adjuvante tipicamente incluem pelo menos um óleo e pelo
20 menos um tensoativo, com o óleo(s) e tensoativo(s) sendo biodegradáveis (metabolizáveis) e biocompatíveis. As gotículas de óleo na emulsão são têm geralmente menos que 5 µm de diâmetro, tipicamente com um diâmetro submicrométrica. Tamanhos de partícula pequena podem ser
25 atingidos com um microfluidificador para fornecer emulsões estáveis. Gotículas com um tamanho menor que 220 nm são preferidas na vez que elas podem ser submetidas a esterilização de filtro.

As emulsões podem incluir óleos como aqueles de um
30 animal (tal como peixe) ou de fonte vegetal, em vez de

óleos minerais. Fontes para óleos vegetais incluem nozes, sementes e grãos. Óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de coco e óleo de oliva, os mais comumente disponíveis, exemplificam os óleos de nozes. Óleo de jojoba pode ser
5 usado, por exemplo, obtido do grão da jojoba. Óleos de sementes incluem óleo de açafrão, óleo de semente de algodão, óleo de semente de girassol, óleo de semente de gergelim e outros. No grupo de grãos, o óleo de milho é o mais facilmente disponível, mas o óleo de outros grãos
10 cereais como trigo, aveias, centeio, arroz, teff, tritcale e outros também podem ser usados. Ésteres de ácido graxo de 6-10 carbonos de glicerol e 1,2-propanodiol, embora não ocorram naturalmente em óleos de semente, podem ser preparados por hidrólise, separação e esterificação dos
15 materiais adequados iniciando a partir dos óleos de nozes e sementes. Gorduras e óleos de leite de mamífero são metabolizáveis e podem, portanto, ser usados na prática dessa invenção. Os procedimentos para separação, purificação, saponificação e outros meios necessários para
20 obter óleos puros de fontes animais são bem conhecidos na técnica. A maioria dos peixes contém óleos metabolizáveis que podem ser facilmente recuperados. Por exemplo, óleo de fígado de bacalhau, óleos de fígado de tubarão, e óleo de baleia como espermacete exemplificam vários dos óleos de
25 peixe que podem ser usados nessa. Um número de óleos de cadeia ramificada é sintetizado bioquimicamente em unidades de isopreno de 5-carbonos e são geralmente referidos como terpenóides. Óleos de fígado de tubarão contêm terpenóides ramificados, insaturados conhecidos como esqualeno,
30 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno,

que é particularmente aqui preferido. Esqualano o análogo saturado ao esqualeno, é também um óleo preferido. Óleos, que incluem esqualeno e esqualano, são facilmente disponíveis de fontes comerciais ou podem ser obtidos por métodos conhecidos na técnica. Outros óleos preferidos são os tocoferóis (veja abaixo). Misturas de óleos podem ser usadas.

Tensoativos podem ser classificados por seu "HLB" (equilíbrio hidrofília/lipofília). Tensoativos preferidos da invenção têm um HLB de pelo menos 10, preferivelmente pelo menos 15, e mais preferivelmente pelo menos 16. A invenção pode ser usada com tensoativos que incluem, sem limitação: os tensoativos de ésteres de polioxietileno sorbitano (comumente referidos como os Tweens), especialmente polisorbato 20 e polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), e/ou óxido de butileno (BO), vendidos sob o nome comercial DOWFAX™, como copolímeros em bloco lineares EO/PO; octoxinóis, que podem variar no número de grupos de repetição de etoxi(oxi-1,2-etanodiil), com octoxinol-9 (Triton X-100, ou t-octilfenoxipolietoxietanol) sendo de particular interesse; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolipídeos como fosfatidilcolina (lecitina); éteres graxos de polioxietileno derivados de lauril, cetil, estearil e oleil álcoois (conhecidos como tensoativos Brij), como trietilenoglicol monolauril éter (Brij 30); e ésteres de sorbitano (comumente conhecidos como SPANs), como trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaurato de sorbitano. Tensoativos preferidos para inclusão em uma emulsão são Tween 80 (monooleato de

polioxietileno sorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina e Triton X-100. Misturas de tensoativos podem ser usadas, por exemplo, misturas de Tween 80/Span 85, ou misturas de Tween80/Triton-X100.

5 Adjuvantes de emulsão óleo em água úteis com a invenção incluem, mas não são limitados a:

- uma emulsão de esqualeno, tocoferol e Tween 80. A emulsão pode incluir solução salina tamponada por fosfato. Ela também pode incluir Span 85 (por exemplo, a 1%) e/ou
10 lecitina. Essas emulsões podem ter de 2 a 10% de esqualeno, de 2 a 10% de tocoferol e de 0,3 a 3% de Tween 80, e a proporção de peso de esqualeno:tocoferol é preferivelmente ≤ 1 uma vez que essa fornece uma emulsão mais estável. Uma tal emulsão pode ser feita por dissolução de Tween 80 em
15 PBS para gerar uma solução a 2%, então mistura de 90 ml dessa solução com a mistura de (5g de DL- α -tocoferol e 5 ml de esqualeno), então microfluidificação da mistura. A emulsão resultante pode ter gotículas de óleo submicrométricas, por exemplo, com um diâmetro médio entre
20 100 e 250 nm, preferivelmente cerca de 180 nm.

- uma emulsão de esqualeno, tocoferol, e um detergente de Triton (por exemplo Triton X-100).

- uma emulsão de esqualano, polisorbato 80 e poloxamer 401 ("PluronicTM L121"). A emulsão pode ser formulada em
25 solução salina tamponada por fosfato, pH 7,4. Essa emulsão é um veículo de liberação útil para dipeptídeos de muramil, e tem sido usado com treonil-MDP no adjuvante "SAF-1" [7] (0,05-1% Thr-MDP, 5% esqualano, 2,5% Pluronic L121 e 0,2% polisorbato 80). Ela também pode ser usada sem o Thr-MDP,
30 como no adjuvante "AF" [8] (5% esqualano, 1,25% Pluronic

L121 e 0,2% polisorbato 80). Microfluidificação é preferida.

- uma emulsão que tem de 0,5-50% de um óleo, 0,1-10% de um fosfolipídeo, e 0,05-5% de um tensoativo não iônico.

5 Como descrito na referência 9, componentes preferidos de fosfolipídeo são fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina e cardiolipina. Tamanho de gotículas submicrométricas são vantajosos.

10 - uma emulsão óleo em água submicrométrica de um óleo não metabolizável (como óleo mineral leve) e pelo menos um tensoativo (como lecitina, Tween 80 ou Span 80). Aditivos podem ser incluídos, como Quila saponina, colesterol, um conjugado saponina-lipofílico (como GPI-0100, descrito na
15 referência 10, produzido por adição de amina alifática a desacilsaponina via grupo carboxil de ácido glicurônico), brometo de dimetildiocetadecilamônio e/ou N,N-diocetadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.

- uma emulsão em que uma saponina (por exemplo Quila
20 ou QS21) e um esterol (por exemplo um colesterol) são associados como micelas em hélice [11].

As emulsões são preferivelmente misturadas com antígeno extemporaneamente, no momento da liberação. Portanto, o adjuvante e antígeno são tipicamente mantidos
25 separadamente em um pacote ou vacina distribuída, prontos para formulação final no momento do uso. O antígeno estará geralmente em uma forma aquosa, de modo que a vacina é finalmente preparada por mistura de dois líquidos. A proporção de volume dos dois líquidos para mistura pode
30 variar (por exemplo, entre 5:1 e 1:5) mas é geralmente de

cerca de 1:1.

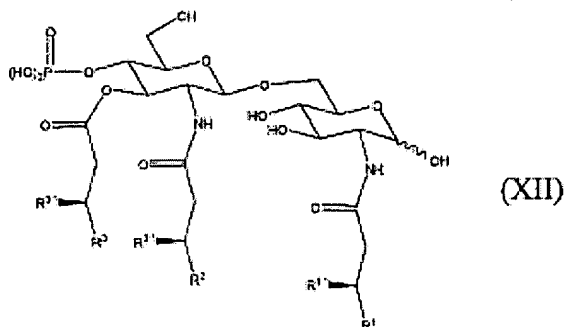
Quando a composição inclui um tocoferol, qualquer um de α , β , γ , δ , ϵ , ou ξ tocoferóis pode ser usado, mas α -tocoferóis são preferidos. O tocoferol pode ter várias formas, por exemplo, diferentes sais e/ou isômeros. Sais incluem sais orgânicos, como succinato, acetato, nicotinato etc. D- α -tocoferol e DL- α -tocoferol podem ser usados. Um α -tocoferol preferido é DL- α -tocoferol, e o sal preferido desse tocoferol é o succinato.

10 3D-MPL

Monofosforil lipídeo A 3-O-desacilado (3D-MPL; também referido como monofosforil lipídeo A 3 de-O-acilado ou 3-O-desacil-4'-monofosforil lipídeo A) é um adjuvante conhecido. O nome indica que a posição 3 da glicosamina de extremidade redutora no monofosforil lipídeo A é desacilada. 3D-MPL foi preparado a partir de um mutante sem heptose de *Salmonella minnesota*, e é quimicamente similar ao lipídeo A mas é desprovido de um grupo fosforil estável em ácido e um grupo acil estável em base. Ele ativa células da linhagem de monócitos/macrófagos e estimula a liberação de várias citocinas, incluindo IL-1, IL-12, TNF- α e GM-CSF. A preparação de 3D-MPL foi originalmente descrita na referência 12, e o produto foi fabricado e vendido por Corixa Corporation sob o nome comercial "MPL". Detalhes adicionais podem ser encontrados na referências 13 a 16.

3D-MPL pode ter a forma de uma mistura de moléculas relacionadas, que variam por sua acilação (por exemplo, tendo 3, 4, 5 ou 6 cadeias de acil, que podem ser de comprimento diferentes). Os dois monossacarídeos de glicosamina (também conhecidas como 2-desoxi-2-amino-

glicose) são N-acilados em seus carbonos de posição 2 (ou seja, nas posições 2 e 2'), e há também O-acilação na posição 3'. O grupo anexado ao carbono 2 tem a fórmula -NH-CO-CH₂-CR¹R^{1'}. O grupo anexado ao carbono 2' tem a fórmula -NH-CO-CH₂-CR²R^{2'}. O grupo anexado ao carbono 3' tem a fórmula -O-CO-CH₂-CR³R^{3'}. Uma estrutura representativa é:



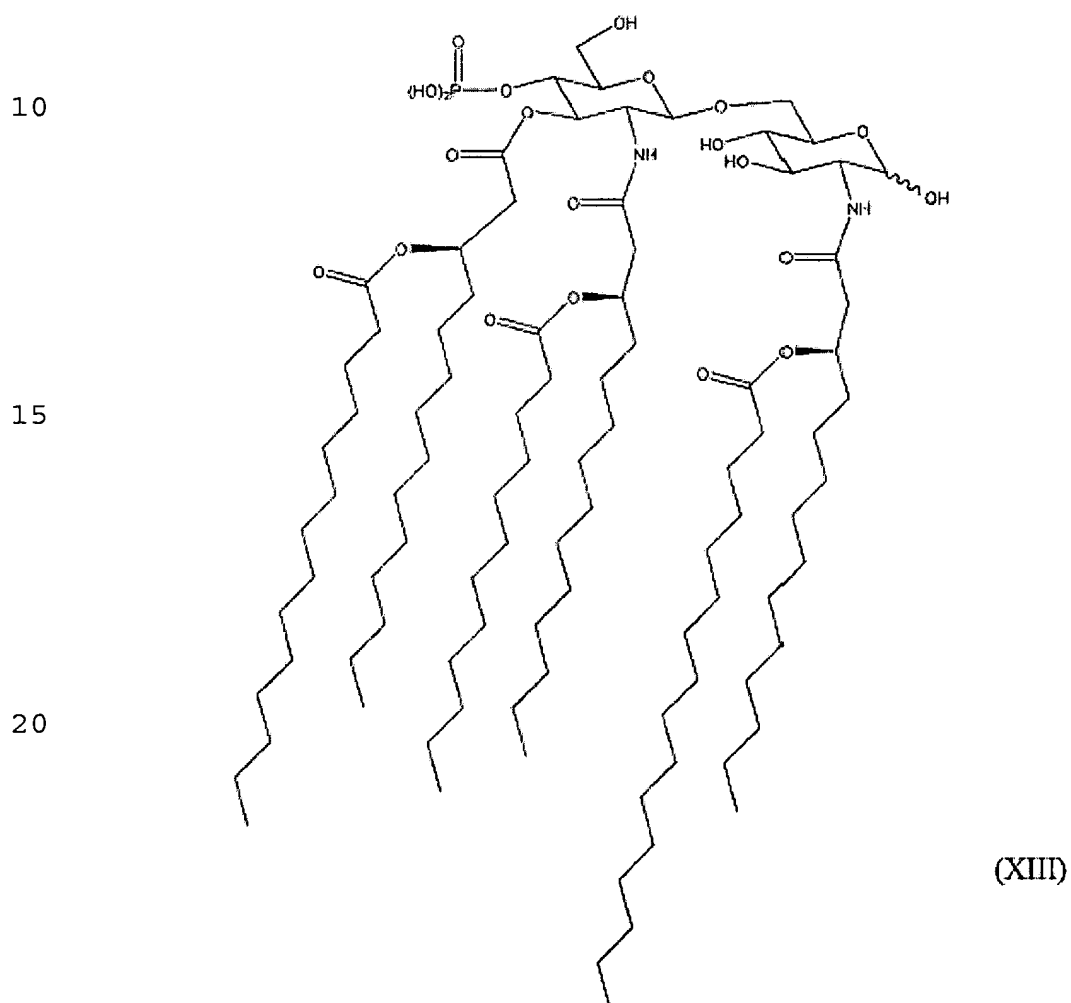
Grupos R¹, R² e R³ são cada um independentemente - (CH₂)_n-CH₃. O valor de n é preferivelmente entre 8 e 16, mais preferivelmente entre 9 e 12, e é mais preferivelmente 10.

Grupos R^{1'}, R^{2'} e R^{3'} podem ser independentemente: (a) -H; (b) -OH; ou (c) -O-CO-R⁴, em que R⁴ é -H ou -(CH₂)_m-CH₃, em que o valor de m é preferivelmente entre 8 e 16, e é mais preferivelmente 10, 12 ou 14. Na posição 2, m é preferivelmente 14. Na posição 2', m é preferivelmente 10. Na posição 3', m é preferivelmente 12. Grupos R^{1'}, R^{2'} e R^{3'} são assim preferivelmente grupos -O-acil de ácido dodecanóico, tetradecanóico ou hexadecanóico.

Quando todos de R^{1'}, R^{2'} e R^{3'} são -H então o 3D-MPL em apenas 3 cadeias acil (uma em cada das posições 2, 2' e 3'). Quando apenas dois de R^{1'}, R^{2'} e R^{3'} são -H então o 3D-MPL pode ter 4 cadeias acil. Quando apenas um de R^{1'}, R^{2'} e R^{3'} é -H então o 3D-MPL pode ter 5 cadeias acil. Quando nenhum de R^{1'}, R^{2'} e R^{3'} é -H então o 3D-MPL pode ter 6 cadeias acil. O adjuvante 3D-MPL usado de acordo com a

invenção pode ser uma mistura dessas formas, com de 3 a 6 cadeias acil, mas é preferível incluir 3D-MPL com 6 cadeias acil na mistura, e em particular para assegurar que a forma de cadeia de hexaacil faça pelo menos 10% em peso do 3D-MPL total, por exemplo $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$ ou mais. 3D-MPL com 6 cadeias acil é a forma mais ativa de adjuvante.

Portanto, a forma mais preferida de 3D-MPL para inclusão nas composições da invenção é:



Quando 3D-MPL é usado na forma de uma mistura então referências a quantidades ou concentrações de 3D-MPL nas composições da invenção referem-se às espécies combinadas de 3D-MPL na mistura.

Em condições aquosas, 3D-MPL pode formar agregados micelares ou partículas com diferentes tamanhos, por

exemplo, com um diâmetro <150 nm ou >500 nm. Cada um desses ou ambos podem ser usados com a invenção, e as melhores partículas podem ser selecionadas por ensaio rotineiro. Partículas menores (por exemplo, pequenas o suficiente para
5 gerar uma suspensão aquosa transparente de 3D-MPL) são preferidas para uso de acordo com a invenção por causa de sua atividade superior [17]. Partículas preferidas têm um diâmetro médio menor que 220 nm, mais preferivelmente menos que 200 nm ou menos que 150 nm ou menos que 120 nm, e podem
10 até ter m diâmetro médio menor que 100 nm. Na maioria dos casos, no entanto, o diâmetro médio não será menor que 50 nm. Essas partículas são pequenas o suficiente para serem adequadas para esterilização em filtro. O diâmetro da partícula pode ser avaliado por técnica rotineira de
15 disseminação de luz dinâmica, que revela um diâmetro médio de partícula. Quando uma partícula é dita como tendo um diâmetro de x nm, haverá geralmente uma distribuição de partículas por volta dessa média, mas pelo menos 50% em número (por exemplo, ≥60%, ≥70%, ≥80%, ≥90%, ou mais) das
20 partículas terão um diâmetro na faixa de $x \pm 25\%$.

O 3D-MPL pode ser usado por si ou como um adjuvante, ou em combinação com um ou mais de outros compostos adjuvantes. Por exemplo, é conhecido o uso de 3D-MPL em combinação com a saponina QS21 [18], com QS21 e uma emulsão
25 óleo em água [19], com um fosfato de alumínio [20], com hidróxido de alumínio [21], ou com saponinas & interleucina-12 [22].

Uma mistura preferida de adjuvante, particularmente para uso com HBsAg, compreende uma mistura de 3D-MPL e um
30 sal de alumínio, preferivelmente fosfato de alumínio.

Vantajosamente, o 3D-MPL é adsorvido no sal de alumínio. Preferivelmente pelo menos 50% (em peso) do 3D-MPL é adsorvido por exemplo $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $> 98\%$ ou mais.

5 Adjuvantes de alumínio atualmente em uso são tipicamente referidos como adjuvantes de "hidróxido de alumínio" ou como "fosfato de alumínio". Esses são nomes de conveniência, no entanto, como nenhum é uma descrição precisa do real composto químico que é presente (por
10 exemplo, veja o capítulo 9 da referência 2). Para combinação com um adjuvante graxo como 3D-MPL, a invenção pode usar qualquer um dos "hidróxido" ou sais de "fosfato" que estão em uso geral como adjuvantes.

Os adjuvantes conhecidos como "hidróxido de alumínio"
15 são tipicamente sais de oxihidróxido de alumínio, que são comumente, pelo menos parcialmente, cristalinos. Oxihidróxido de alumínio, que pode ser representado pela fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, pode ser distinto de outros compostos de alumínio, como hidróxido de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$, em sua
20 espectroscopia de infravermelho (IR), em particular pela presença de uma banda de absorção a 1.070cm^{-1} e uma ramificação forte a $3.090\text{--}3.100\text{cm}^{-1}$ (capítulo 9 da ref. 2).

Os adjuvantes conhecidos como "fosfato de alumínio" são tipicamente hidroxifosfatos de alumínio, freqüentemente
25 também contendo uma pequena quantidade de sulfato. Eles podem ser obtidos por precipitação, e as condições de reação e concentrações durante a precipitação influencia o grau de substituição de fosfato por hidroxil no sal. Hidroxifosfatos geralmente têm uma proporção molar de
30 PO_4/Al molar entre 0,3 e 0,99. Hidroxifosfatos podem ser

distintos de AlPO_4 pela presença de grupos hidroxil. Por exemplo, uma banda de espectro de IR a 3.164 cm^{-1} (por exemplo, quando aquecido a 200°C) indica a presença de grupos hidroxil estruturais (capítulo 9 da ref. 2).

5 A proporção molar de $\text{PO}_4/\text{Al}_3^+$ molar de um adjuvante de fosfato de alumínio estará geralmente entre 0,3 e 1,2, preferivelmente entre 0,8 e 1,2, e mais preferivelmente $0,95 \pm 0,1$. O fosfato de alumínio será geralmente amorfo, particularmente para sais de hidroxifosfato. Um adjuvante
10 típico é hidroxifosfato de alumínio amorfo com proporção molar de PO_4/Al entre 0,84 e 0,92, incluída a 0,6mg de Al_3^+ /ml. O fosfato de alumínio geralmente será particulado. Diâmetros típicos das partículas são na faixa de 0,5-20 μm (por exemplo, cerca de 5-10 μm) depois de qualquer adsorção
15 de antígeno.

 O PZC de fosfato de alumínio é inversamente relacionado ao grau de substituição de fosfato por hidroxil, e esse grau de substituição pode variar dependendo das condições de reação e concentração de
20 reagentes usados para a preparação do sal por precipitação. PZC é também alterado por troca da concentração de íons fosfato livres em solução (mais fosfato = PZC mais ácido) ou por adição de um tampão como um tampão de histidina (torna PZC mais básico). Fosfato de alumínio usado de acordo com
25 a invenção geralmente terá um PZC entre 4,0 e 7,0, mais preferivelmente entre 5,0 e 6,5, por exemplo, cerca de 5,7.

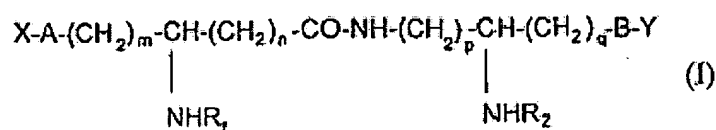
 Uma solução de fosfato de alumínio usada para preparar a composição da invenção pode conter um tampão (por exemplo um tampão de fosfato ou histidina ou Tris), mas isso não é
30 sempre necessário. A solução de fosfato de alumínio é

preferivelmente estéril e livre de pirógeno. A solução de fosfato de alumínio pode incluir íons de fosfato aquoso livres, por exemplo, presentes em uma concentração entre 1,0 e 20 mM, preferivelmente entre 5 e 15 mM, e mais
 5 preferivelmente cerca de 10 mM. A solução de fosfato de alumínio também pode compreender cloreto de sódio. A concentração de cloreto de sódio é preferivelmente na faixa de 0,1 a 100 mg/ml (por exemplo 0,5-50 mg/ml, 1-20 mg/ml, 2-10 mg/ml) e é mais preferivelmente cerca de 3 ± 1 mg/ml. A
 10 presença de NaCl facilita a medição correta do pH antes da absorção de antígenos.

O fosfato de alumínio é preferivelmente usado na forma de uma solução aquosa à qual 3D-MPL (e, opcionalmente, um antígeno) é adicionado (NB: é padrão referir-se a fosfato
 15 de alumínio aquoso como uma "solução" embora, em um ponto de vista físico-químico estrito, o sal é insolúvel e forma uma suspensão). É preferível diluir o fosfato de alumínio na concentração necessária e assegurar uma solução homogênea antes da adição de 3D-MPL e/ou do antígeno.

20 N-acil-pseudodipeptides

Um adjuvante de N-acil-pseudodipeptídeo preferivelmente inclui um grupo hidroxil que é esterificado por um grupo ácido na forma neutra ou carregada. Os grupos acil dão aos pseudodipeptídeos um caráter graxo. O
 25 adjuvante preferivelmente tem a fórmula (I):



Em que:

- R^1 é um grupo acil derivado de um ácido
 30 carboxílico de cadeia linear ou ramificada, saturado ou

insaturado que tem de 2 a 24 átomos de carbono, o ácido carboxílico sendo não substituído ou substituído com um ou mais substituintes selecionados do grupo que consiste em hidroxil, 5 alquil, alcoxi, aciloxi, amino, acilamino, aciltio e (grupos (C₁₋₂₄)alquil)tio;

- R² é um grupo acil derivado de um ácido carboxílico de cadeia linear ou ramificada, saturado ou insaturado que tem de 2 a 24 átomos de carbono, o ácido carboxílico sendo não substituído ou substituído com um ou 10 mais substituintes selecionados do grupo que consiste em hidroxil, alquil, alcoxi, aciloxi, amino, acilamino, aciltio e (grupos (C₁₋₂₄)alquil)tio;

- X é um átomo de hidrogênio ou um grupo ácido em forma neutra ou carregada;

15 - Y é um átomo de hidrogênio ou um grupo ácido em forma neutra ou carregada;

- A é um átomo de oxigênio, um átomo de enxofre ou um grupo imino -NH-;

20 - B é um átomo de oxigênio, um átomo de enxofre ou um grupo imino -NH-;

- m é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10;

- n é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10;

- p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10;

- q é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10;

25 desde que pelo menos um dos substituintes X ou Y designe um grupo ácido em forma neutra ou iônica.

O adjuvante pode ser usado em forma de ácido ou sal, com uma base orgânica ou mineral.

O sal que forma bases para uso terapêutico inclui 30 principalmente bases de metal alcalino como hidróxidos de

sódio, potássio ou lítio, sais de amônio; bases de metal alcalino terroso como hidróxido de cálcio ou estrôncio e sais de magnésio; sais de metal ferroso e outros; bases orgânicas como aquelas derivadas de aminas primárias, secundárias, terciárias como metilamina, dietilamina, monoetanolamina, dietanolamina, benzilamina, N-metilbenzilamina, veratrilamina, trimetoxibenzilamina; aminoácidos básicos como lisina e ornitina ou açúcares de amino. Exemplos de bases que não são usadas terapêuticamente são brucina, estriquinina, agmatina, homarina, glicosamina, N-metilglicosamina ou N-metilmorfolina.

Substituintes preferidos X e Y são selecionados de:

- carboxi [(C₁₋₅)alquil]
- 15 - CH-[(CH₂)_rCOOH] [(CH₂)_sCOOH], em que : r é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; s é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5
- fosfono [(C₁₋₅)alquil]
- dihidroxifosforiloxi [(C₁₋₅)alquil]
- dimetoxifosforil
- 20 - fosfono
- hidroxissulfonil
- hidroxissulfonil[(C₁₋₅)alquil]
- hidroxissulfoniloxi [(C₁₋₅)alquil]

Quando os substituintes X e/ou Y designam um grupo ácido em forma neutra, é feita referência à forma carboxílica, sulfônica ou fosfórica livre. Quando o grupo ácido está em forma carregada, é feita referência à forma de sal carboxílico, sulfônico ou fosfórico, por adição de uma base orgânica ou mineral, preferivelmente uma para uso terapêutico. Considerações similares se aplicam em que X

e/ou Y designam um grupo carboxilalquil, alquenilbiscarboxílico, hidroxissulfonil, hidroxissulfonilalquil, hidroxissulfonil-oxialquil, fosfonoalquil ou fosforil-oxialquil.

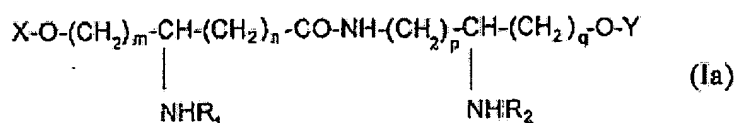
5 Quando $m=1$ e $n=0$, o adjuvante deriva de serina. Quando $m=2$ e $n=0$, o adjuvante deriva de homosserina. Se $m=3$ e $n=0$, é feita referência a um composto pentahomosserina. Se $m=4$ e $n=0$, é feita referência a um composto hexahomosserina.

Quando $p=3$ e $q=1$, o produto de interesse pode ser um
10 composto de citrulina, ornitina ou arginina. Quando $p=4$ e $q=1$, é feita referência a um composto de homoarginina ou lisina.

R^1 e R^2 incluem derivados de acil de cadeia linear ou ramificada, saturados ou insaturados que têm vários
15 tamanhos de cadeia, de natureza distinta ou idêntica, que pode ter um ou mais substituintes selecionados do grupo que consiste em grupos alquil, amino, acilamino, hidroxil, alcoxi, aciloxi, aciltio e alquiltio.

Exemplos de tais derivados acilados, substituídos são
20 radicais ricinoleil, 1,2-hidroxiestearoil, 2-hidroxi-3-metil butiroil, 3-hidroxi-2-aminopentanoil, palmitoil, elaidil, eleostearoil, araquidoil, araquidonil, gadoleil, behenil, erucil, 8-metildecanoil, 9-metildecanoil, docosohexaenoil ou eicosapentaneoil.

25 Adjuvantes preferidos têm a fórmula (Ia), em que A e B são átomos de oxigênio:



Na fórmula (Ia), X e Y são preferivelmente um átomo de
30 hidrogênio ou um grupo fosfono.

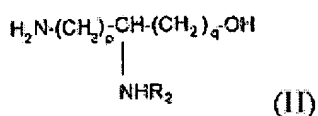
Adjuvantes adequados de fórmula (Ia) incluem:

- 3-(3-dodecanoiloxitetradecanoilamino) 9-(3-hidroxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1 e/ou 10-dihidrogêniofosfato e seus sais de adição formados com uma base orgânica ou mineral,
- 3-(3-dodecanoiloxi-tetradecanoilamino) 9-(3-hidroxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1,10-bis(dihidrogêniofosfato) e seus sais de adição formados com uma base orgânica ou mineral,
- 10 - 3-(3-hidroxitetradecanoilamino) 9-(3-dodecanoiloxitetradecanoilamino) 4-oxo-5- azadecan-1,10-diol 1,10-bis(dihidrogêniofosfato) e seus sais de adição formados com uma base orgânica ou mineral,
- 3-(3-dodecanoiloxitetradecanoilamino) 9-(3-hidroxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1-dihidrogêniofosfato e seus sais de adição formados com uma base orgânica ou mineral,
- 15 - 3-(3-hidroxitetradecanoilamino) 9-(3-dodecanoiloxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1-dihidrogêniofosfato e seus sais de adição formados com uma base orgânica ou mineral
- 20 - 3-(3-hidroxitetradecanoilamino) 9-(3-dodecanoiloxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecano-1,10-diol 10-dihidrogêniofosfato e seus sais de adição formados com uma base orgânica ou mineral.
- 25

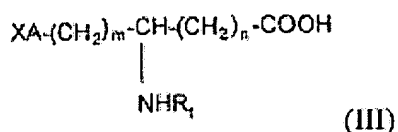
Métodos para síntese de um adjuvante de fórmula (I) são revelados em detalhes na referência 23, e incluem métodos que compreendem as etapas de: proteção dos grupos funcionais de amina nas posições (q+1) e ω de um ácido diamino por bloqueio dos reagentes com acidólise e

30

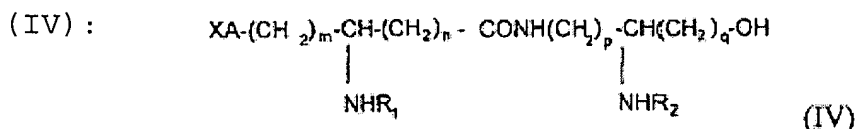
hidrogenólise, respectivamente; reação do grupo funcional carboxílico livre com um agente redutor para gerar um álcool correspondente; desproteção do grupo funcional de amina (q+1) e então acilação por meio de um derivado funcional de ácido carboxílico de fórmula R²OH, e subsequente liberação do grupo funcional de amina terminal por hidrogenólise para gerar um diamino álcool de fórmula geral II:



10 Cujo amino álcool é condensado na presença de um agente de condensação de peptídeo em um solvente inerte, junto com um composto de aminoácido ω-hidroxi, ω-amino ou ω-tio de fórmula geral III:



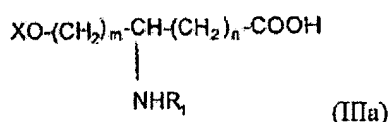
15 para fornecer um composto de dipeptídeo de fórmula



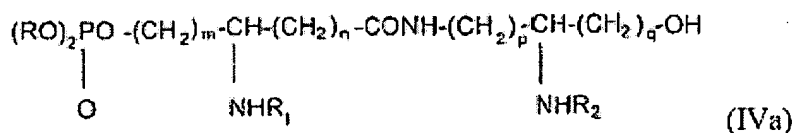
o grupo funcional de álcool livre terminal do qual
20 podem ser, se necessário, protegido (por exemplo por um grupo alquil ou acil, ou qualquer outro grupo de proteção adequado) ou substituído, se necessário, na presença de um agente de ligação. O álcool protegido pode ser submetido a uma hidrogenação catalítica ou outro tratamento de
25 desproteção para obter o derivado de fórmula geral I.

Métodos para síntese de adjuvantes de fórmula (II) são também revelados em detalhe na referência 23, e incluem métodos que compreende as etapas de: proteção de grupos funcionais de amina nas posições (q+1) e ω de um ácido
30 diamino de fórmula H₂N(CH₂)_pCHNH₂(CH₂)_{q+1}COOH por proteção de

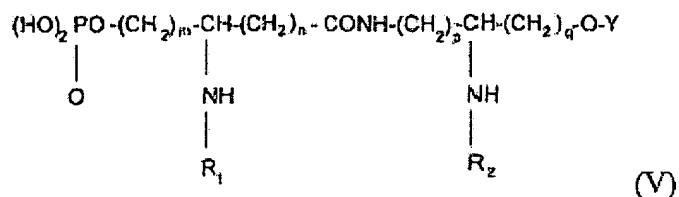
reagentes que são facilmente submetidos a acidólise e hidrogenólise, respectivamente; reação do grupo funcional carboxílico livre com um agente redutor para gerar um álcool correspondente; desproteção do grupo funcional de amina na posição (q+1) e então acilação por meio de um derivado funcional de ácido carboxílico de fórmula R^2OH , então desproteção do grupo funcional de amina terminal por hidrogenólise para obter um amino álcool de fórmula geral II; cujo amino álcool é condensado na presença de um agente de condensação de peptídeo em um solvente inerte, junto com um derivado funcional de aminoácido ω -hidroxi, de fórmula geral IIIa:



em que X é radical dialquiloxi ou diariloxi- fosforil de fórmula $(\text{RO})_2\text{P}-\text{O}$ para gerar um composto semelhante a peptídeo de fórmula IVa:



em que R é um radical que é facilmente submetido a hidrogenólise, o outro grupo funcional de álcool do qual pode ser, se desejado, fosforilado por um agente de fosforilação na presença de um agente de ligação, se necessário. O álcool protegido pode ser submetido a hidrogenação catalítica por um lado para desproteger o grupo funcional de álcool opcionalmente presente no R_2 de grupo acil e no outros, liberar o grupo funcional de fosfato e então desproteger através de hidrogenólise o segundo grupo funcional de fosfato opcionalmente presente, para obter o derivado de fórmula geral V:

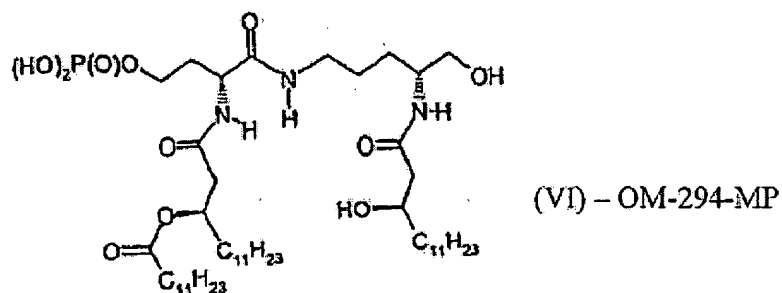


e opcionalmente realizar a etapa adicional de formação
5 de sal por meio de uma base orgânica ou mineral.

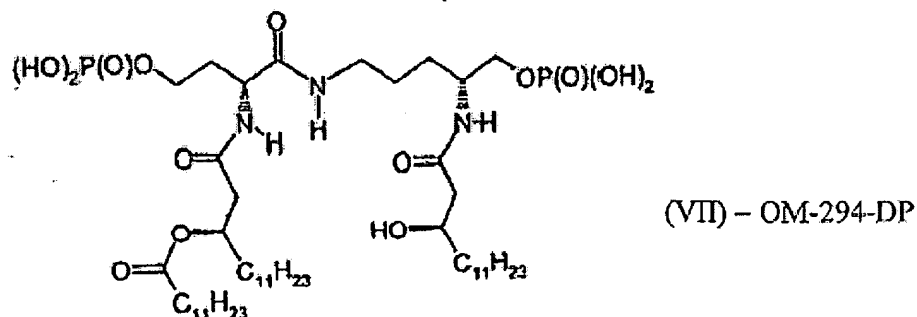
A estereoquímica de centros quirais dos grupos
acilamino é determinada pela configuração de aminoácido
inicialmente usada enquanto a estereoquímica de grupos
acilamino depende da configuração de ácido graxo
10 inicialmente usada. Um pode iniciar a partir de um diamino
ácido tendo configuração L ou D de uma natureza racêmica.
Um pode iniciar a partir de um aminoácido hidroxilado de
configuração L ou D de uma mistura racêmica. Todos esses
estereoisômeros ou diastereoisômeros são incluídos no
15 escopo da invenção.

Adjuvantes particularmente preferidos, e notavelmente
compostos mono- e bis-fosforilados, são aqueles que são
conhecidos como "OM-294-MP" (fórmula VI) e "OM-294-DP"
(fórmula VII) [23]:

20



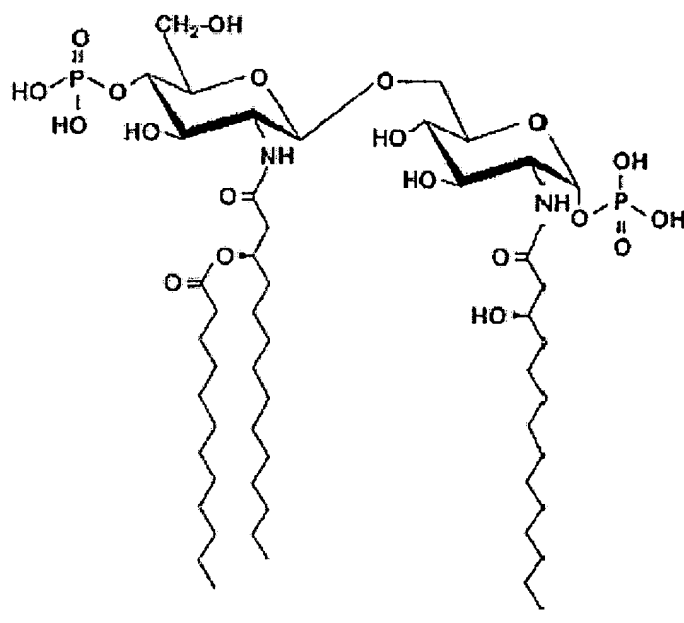
25



30

OM-174

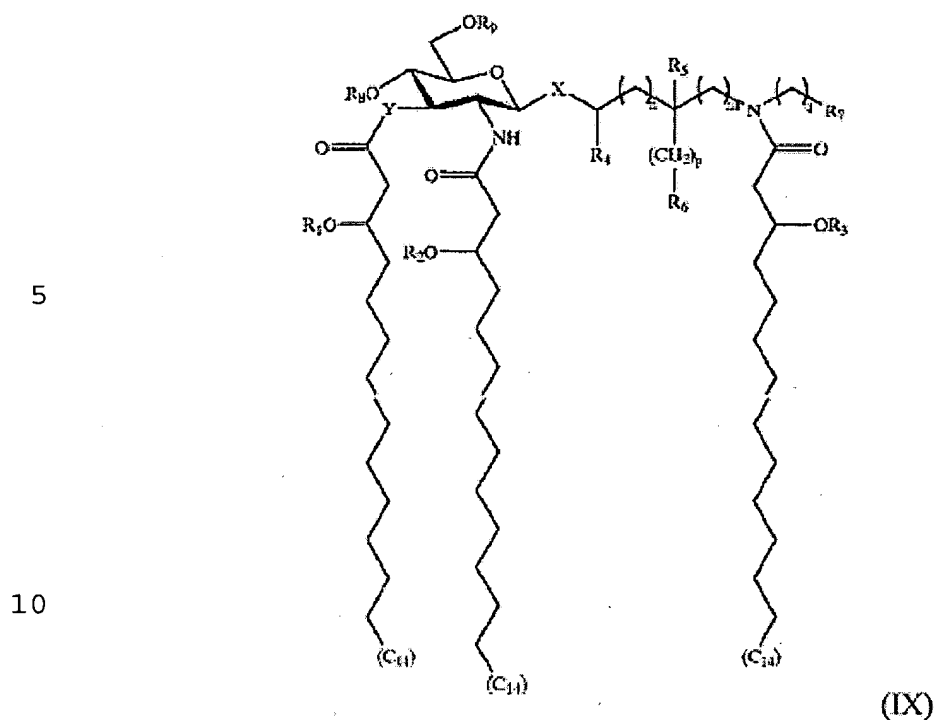
OM-174 pode ser obtido através de síntese química, e retém um motivo de triacil de lipídeo A. Ele é descrito em maiores detalhes nas referências 24-26. A Referência 26 dá a fórmula de OM-174 como:



Portanto, OM-174 tem uma estrutura de diglicosamina $\beta(1\rightarrow6)$ -ligada 1,4'-bifosforilada, como encontrado no lipídeo natural A. OM-174 pode estar presente na forma de agregados com uma estrutura H_1 micelar, ou seja, em que as moléculas de lipídeo são embaladas com sua estrutura em uma superfície cilíndrica com as cadeias acil direcionadas para o interior, com os cilindros em si sendo embalados de modo hexagonal. Uma fase cúbica pode ser ausente. Uma fase H_{II} também pode estar ausente.

Derivados de fosfato de glicosaminídeo

Derivados de fosfato de aminoalquil glicosaminídeo (AGP) (por exemplo RC-529 [27,28]) são adjuvantes graxos por causa da cadeia acil. Em geral, esses derivados podem ter a seguinte fórmula [29]:



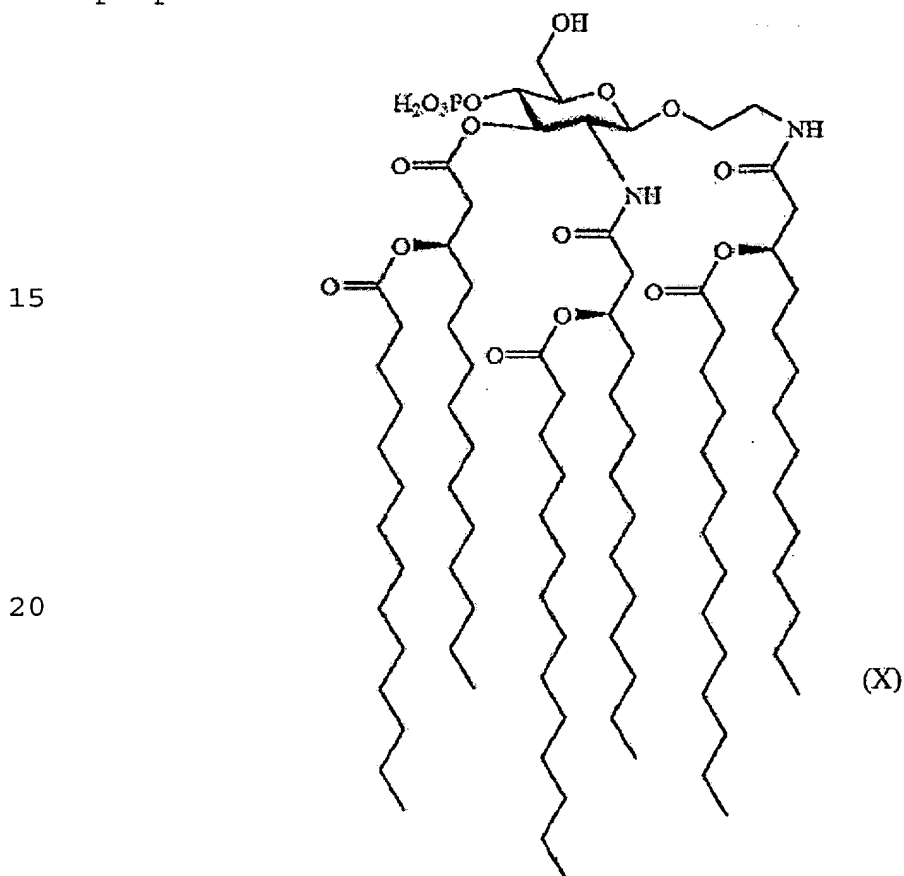
em que:

- X representa um átomo de oxigênio ou enxofre na posição axial ou equatorial;
- 15 - Y representa um átomo de oxigênio ou grupo NH;
- "n", "m", "p" e "q" são o mesmo ou diferentes e são números inteiros de 0 a 6;
- R₁, R₂, e R₃, que podem ser o mesmo ou diferentes, são resíduos de acil graxo que têm de 1 a cerca de 20
- 20 átomos de carbono e em que um de R₁, R₂ ou R₃ é opcionalmente hidrogênio;
- R₄ e R₅ são o mesmo ou diferentes e são hidrogênio ou metil;
- R₆ e R₇ são o mesmo ou diferentes e são
- 25 hidrogênio, hidroxil, alcoxi, fosfona, fosfonooxi, sulfo, sulfooxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formil ou carboxi e ésteres e amidas desses;
- R₈ e R₉ são o mesmo ou diferentes e são fosfona ou hidrogênio, com preferivelmente pelo menos um de R₈ e/ou
- 30 R₉ sendo fosfona.

A configuração dos centros estereogênicos 3' aos quais os resíduos de acil graxo normais são anexados é R ou S, mas preferivelmente R. A estereoquímica dos átomos de carbono aos quais R₄ ou R₅ são anexados pode ser R ou S.

5 Todos os estereoisômeros, enantiômeros e diastereômeros, e misturas desses, são considerados como dentro do escopo da atual invenção. Adjuvantes adequados incluem sais desses compostos.

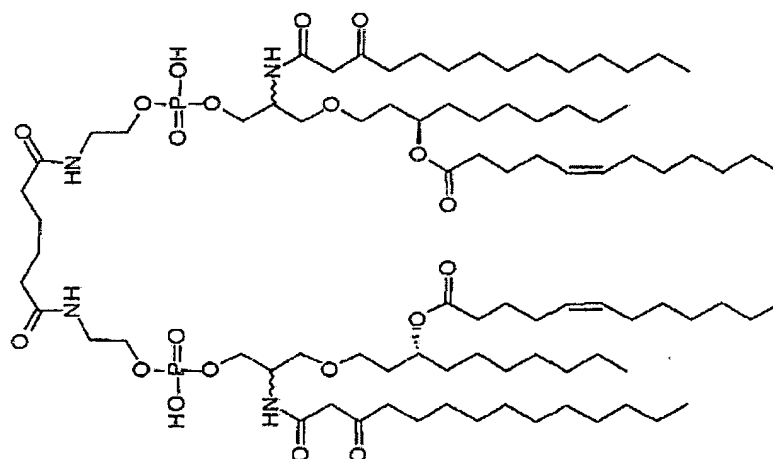
Um composto AGP preferido é "RC-529", que pode ser
10 preparado como descrito na ref. 30:



25 Análogos de lipídeo A sintético acíclico

Um análogo de lipídeo A que pode ser usado como um adjuvante nas composições da invenção é ER-112022 [31], um dímero de fosfolipídeo conectado via uma estrutura acíclica:

5



(XI)

Cada unidade monomérica de ER-112022 contém 3 grupos
 graxos únicos que são ligados indiretamente a um diéster de
 10 fosfato. Os grupos gordurosos incluem uma cadeia de éter de
 10-carbonos, uma cadeia de aciloxi insaturado de 12-
 carbonos ligada à cadeia de éter, e uma cadeia de b-oxo-
 amida de 14-carbonos, ligadas próximo ao fosfodiéster.
 Portanto, o composto tem 3 características únicas comparado
 15 com o lipídeo A de ocorrência natural de *E. coli*: (i) ER-
 112022 é desprovido de uma estrutura de carboidrato
 cíclico; (ii) segundo, os fosfatos são fosfodiésteres
 incorporados nos imites do esqueleto estrutural, diferente
 dos fosfoésteres no lipídeo A de *E. coli*; e (iii) a
 20 estrutura é simétrica (seis ácidos graxos simetricamente
 organizados em um esqueleto não carboidrato).

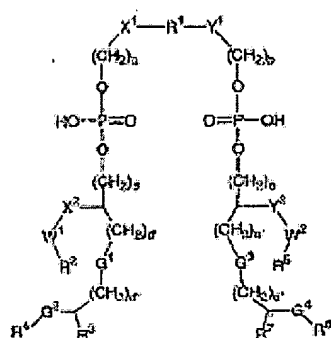
Compostos úteis similares incluem aqueles com a
 fórmula XIV, XV ou XVI, ou sais desses:

XIV

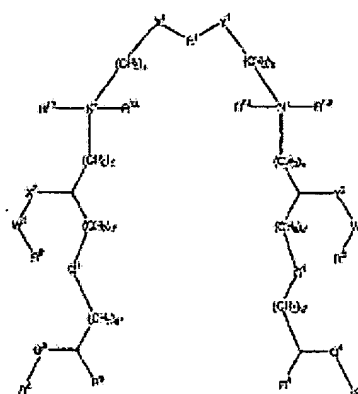
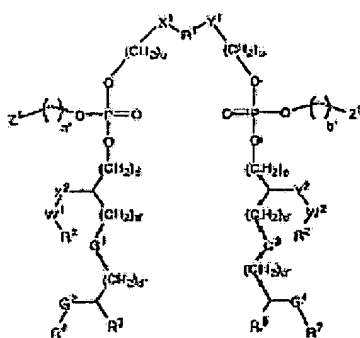
XV

XVI

25

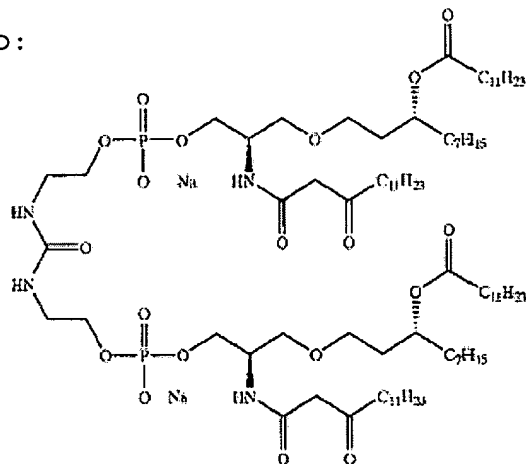


30



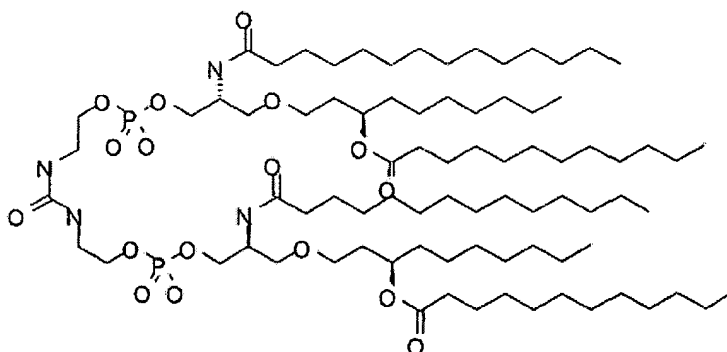
Como definido na referência 32, como "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", "ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", ER 803022 ou "ER 804057" por exemplo:

5



ER804057 (XVII)

10



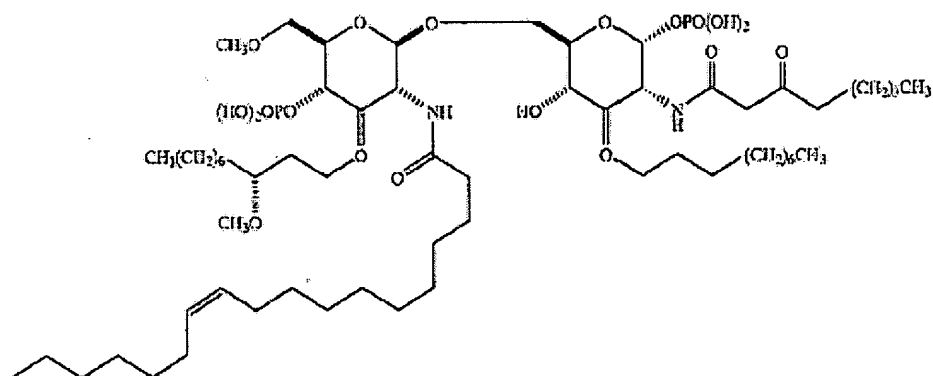
ER-803022 (XVIII)

15

20 Compostos que contêm lipídeos ligados a um esqueleto acíclico que contêm fofato também podem ser usados como

adjuvantes, como o antagonista de TLR4 E5564 [33,34]:

25



(XIX)

O tensoativo

O primeiro aspecto da invenção evita substancialmente o uso de tensoativo durante a purificação de antígeno, de modo que o tensoativo não seja encontrado no componente

30

antígeno usado na invenção. no segundo aspecto, no entanto, o tensoativo é usado, mas em níveis controlados em relação ao adjuvante graxo.

O tensoativo será tipicamente um tensoativo não iônico, particularmente aqueles que são já encontrados em formulações de vacina. Tensoativos orgânicos são preferidos. Esses são tipicamente produtos da reação de um óxido de alquilenos (por exemplo, óxido de etileno) com um álcool graxo, ácido graxo, alquilfenol, alquilamina ou outro composto adequado que tem pelo menos um átomo de hidrogênio ativo. Para a maioria dos tensoativos os álcoois mais comuns, aminas e ácidos têm um comprimento de cadeia de carbono na faixa de C_8 - C_{18} . Os alquilfenóis mais comuns são nonilfenol e octilfenol. Tensoativos contendo resíduos de poli(oxieteno) são particularmente preferidos.

Por exemplo, a invenção pode ser usada com tensoativos que incluem, sem limitação: os tensoativos de ésteres de polioxietileno sorbitano (comumente referidos como os Tweens), especialmente polisorbato 20 e polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), e/ou óxido de butileno (BO), vendidos sob o nome comercial DOWFAXTM, como copolímeros em bloco lineares EO/PO; octoxinóis, que podem variar no número de grupos de repetição etoxi (oxi-1,2-etanodiil), com octoxinol-9 (Triton X-100, ou t-octilfenoxipoli-etoxietanol) sendo de particular interesse; (octilfenoxi)poli-etoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); éteres graxos de polioxietileno derivados de lauril, cetil, estearil e oleil álcoois (conhecidos como tensoativos Brij), como tri-etileneglicol monolauril éter (Brij 30); e ésteres de sorbitano (comumente referidos como

os SPANs), como trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaurato de sorbitano.

Dois tensoativos específicos de interesse são Triton X-100 e polisorbato 20. Assim, modalidades preferidas do primeiro aspecto da invenção evitam substancialmente o uso desses dois tensoativo não iônicos em particular, e preferivelmente evitam substancialmente o uso de qualquer tensoativo não iônico. De forma similar, modalidades preferidas do segundo aspecto da invenção usam um componente antígeno que compreende um desses dois tensoativo não iônicos.

A invenção é particularmente adequada para uso com polisorbato 20. Esse tensoativo tem um perfil de segurança estabelecido para administração a humanos, incluindo em vacinas.

Tensoativos podem ser classificados por seu "HLB" (equilíbrio hidrófilo/lipófilo). Tensoativos preferidos da invenção têm um HLB de pelo menos 10, preferivelmente pelo menos 15, e mais preferivelmente pelo menos 16.

Para evitar a administração de grandes doses do tensoativo a um paciente no segundo aspecto da invenção, é preferível que a concentração do tensoativo na composição não seja de mais que 50 µg/ml, por exemplo, ≤40 µg/ml, ≤35 µg/ml, ≤30 µg/ml, ≤25 µg/ml, ≤20 µg/ml, ≤15 µg/ml, ≤10 µg/ml, ≤5 µg/ml etc. A concentração de ≤20 µg/ml é preferida.

O antígeno

A invenção envolve o uso de um antígeno. A invenção é particularmente adequada para uso com antígenos que são tipicamente purificados pelo uso de tensoativos. Esses

antígenos são tipicamente lipofílicos. Eles incluirão comumente pelo menos uma região de transmembrana, que funciona *in vivo* para localizar o antígeno em uma bicamada lipídica, por exemplo, na superfície de um patógeno. A invenção é particularmente útil para uso com antígenos de superfície viral.

No segundo aspecto da invenção, o componente antígeno inclui um tensoativo. Em vez de ser uma simples mistura de antígeno e tensoativo, é preferível que o antígeno e tensoativo devam estar na forma de um complexo. Complexos de antígeno/tensoativo incluem lipossomos estabilizados por tensoativo que contêm antígeno, e niossomos, que são vesículas formadas a partir de compostos anfifílicos não iônicos sintéticos. Um complexo antígeno/tensoativo preferido é um antígeno de superfície de hepatite B particulado, purificado na presença de tensoativo. A Referência 35 descreve como partículas de HBsAg recombinante podem reter Tween 20 que foi usado durante a sua purificação (até 25 µg Tween 20 por 100 µg HBsAg).

O antígeno mais preferido para uso com o segundo aspecto da invenção é assim o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV), na forma de partículas substancialmente esféricas (diâmetro médio de cerca de 20 nm), incluindo uma matriz de lipídeo que compreende ambos fosfolipídeos e um tensoativo não iônico, como polisorbato 20. Tensoativo não iônico pode ser incorporado na partícula durante a purificação.

Para o primeiro aspecto da invenção, no entanto, uma forma preferida de HBsAg é uma em que HBsAg é purificado sem o uso de tensoativo não iônicos, de modo que a

partícula de HBsAg não incorpore qualquer tensoativo, dessa forma evitando interferência com o adjuvante graxo.

O vírus da hepatite B (HBV) é um dos agentes conhecidos que causa a hepatite viral. O vírion do HBV
5 consiste em um núcleo interno circundado por um revestimento proteico ou capsídeo externo, e o núcleo viral contém o genoma do DNA viral. O principal componente do capsídeo é uma proteína conhecida como antígeno de superfície de HBV ou, mas comumente, "HBsAg", que é
10 tipicamente um polipeptídeo de 226 aminoácidos com um peso molecular de ~24 kDa. Todas as vacinas existentes de hepatite B contêm HBsAg, e quando esse antígeno é administrado a uma pessoa normal ele estimula a produção de anticorpos anti-HBsAg que protegem contra infecção por HBV.

15 Para fabricação de vacina, HBsAg pode ser feito de duas maneiras. O primeiro método envolve a purificação do antígeno em forma particulada do plasma de portadores de hepatite B crônica, uma vez que grandes quantidades de HBsAg são sintetizadas no fígado e liberadas na corrente
20 sangüínea durante uma infecção por HBV. A segunda maneira envolve a expressão da proteína por métodos de DNA recombinante. HBsAg para uso com o método da invenção é recombinantemente expresso em células de levedura. Leveduras adequadas incluem hospedeiros de *Saccharomyces*
25 (como *S.cerevisiae*), *Pichia* (como *P.pastoris*) ou *Hanensula* (como *H.polimorpha*). Como uma alternativa, o antígeno pode ser expresso em células de mamíferos recombinantes (por exemplo em ovário de hamster da China (CHO), células COS, células Bu3, etc.), inseto (por exemplo uso de vetores de
30 baculovírus), ou células de planta. Em geral, entretanto,

expressão em levedura é usada.

O HBsAg expresso em levedura é preferivelmente não glicosilado. Diferentemente de HBsAg nativo (ou seja, como no produto plasma-purificado), HBsAg expresso em levedura é
5 geralmente não glicosilado, e essa é a forma mais preferida de HBsAg para uso com a invenção, porque ele é altamente imunogênico e pode ser preparado sem o risco de contaminação de produto do sangue. Partículas de HBsAg expresso em levedura podem incluir fosfatidilinositol, que
10 não é encontrado em vírion de HBV natural. As partículas também podem incluir uma quantidade não tóxica de LPS para estimular o sistema imune [36].

Vários métodos para purificar HBsAg são conhecidos na técnica (por exemplo, veja as refs 37-62). Desses vários
15 processos, o primeiro aspecto da invenção usa um em que um tensoativo não iônico não é usado. Em contraste, o segundo aspecto da invenção usa um tensoativo não iônico durante a purificação, de modo que o tensoativo torna-se incorporado no produto final particulado de HBsAg. O uso de polisorbato
20 durante o rompimento de células de levedura recombinante no início da purificação é um modo preferido de introduzir o tensoativo nas partículas de HBsAg.

Um método preferido para purificação de HBsAg envolve, após o rompimento da célula: ultrafiltração; cromatografia
25 de exclusão por tamanho; cromatografia de troca aniônica; ultracentrifugação; dessalinização; e filtração estéril. Lisados podem ser precipitados após o rompimento da célula (por exemplo, com o uso de polietileno glicol), deixando HBsAg em solução, pronto para ultrafiltração. Antes ou
30 depois da filtração estéril, é possível estabilizar

partículas de HBsAg por tratamento com formaldeído. O excesso de formaldeído pode ser então removido por ultrafiltração ou por cromatografia. Filtração estéril adicional pode ser usada.

5 O HBsAg é preferivelmente de HBV subtipo adw2.

Em adição à seqüência "S", um antígeno de superfície pode incluir toda ou parte de uma pré-seqüência S, como toda ou parte de uma pré-seqüência S1 e/ou pré-seqüência S2.

10 Outros antígenos de superfície viral que podem ser usados com a invenção serão geralmente glicoproteínas de envelope de um vírus envelopado. Antígenos de superfície viral para uso com a invenção podem incluir, mas não são limitados a:

15 - uma proteína de *retroviridae*. *Retroviridae* incluem lentivírus e espumavírus. Vírus de interesse incluem HTLV-I, HTLV-II, vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da imunodeficiência humana (HIV, incluindo HIV-1 e HIV-2), vírus da imunodeficiência de símios (SIV), vírus espumoso
20 de chimpanzé e espumavírus humano.

- uma proteína de *paramyxoviridae*, como a proteína F. *Paramyxoviridae* incluem (a) *Paramyxovirinae*, que incluem Paramixovírus, Rubulavírus e Morbillivírus e (b) *Pneumovirinae*, que incluem os Pneumovírus. Vírus de
25 interesse incluem vírus parainfluenza (PIV), paramixovírus humano, vírus da peste bovina (Rinderpest), vírus da peste dos pequenos Ruminantes, vírus do sarampo, vírus da caxumba, vírus sincicial respiratório (RSV), Vírus Nipah, Vírus Hendra, Morbilivírus Equino (EMV), Lissavírus e vírus
30 Menangle.

- uma proteína de *Filoviridae*. *Filoviridae* inclui os vírus de Marburg e Ebola.

-uma glicoproteína *spike* de *coronaviridae*. *Coronaviridae* incluem coronavírus e torovírus. Vírus de
5 interesse incluem o coronavírus humano (incluindo o coronavírus da SARS), vírus da bronquite infecciosa aviária, vírus da peritonite infecciosa felina, vírus da hepatite de murídeo, vírus da diarreia epidêmica suína, vírus da encefalomielite de hemaglutinação suína, vírus da
10 gastroenterite transmissível suína e vírus do Berne.

- uma proteína de *rhabdoviridae*, como a proteína G. *Rhabdoviridae* inclui os Rhabdovírus, Vesiculovírus, Lissavírus, Efemerovírus, Citorrabdovírus e Nucleorabdovírus. Vírus de interesse incluem vírus da
15 estomatite vesicular, vírus da raiva, vírus mokola, vírus da febre efêmera bovina.

- uma proteína de *togaviridae*. *Togaviridae* inclui os Alfavírus e Rubivírus. Vírus de interesse incluem vírus Sindbis, vírus da encefalite ocidental e oriental, vírus da
20 floresta de Semliki, vírus da rubéola, vírus Aura, vírus Babanki, vírus avis-A da floresta de Barmah, vírus bebaru, vírus Buggy Creek, vírus chikungunya, vírus dos Everglades, vírus de Fort Morgan, vírus getah, vírus de Highlands J, vírus Kyzylagach, vírus Mayaro, vírus Middelburg, vírus
25 Mucambo, vírus Ndumu, vírus Ockelbo, vírus o'nyong-nyong, Pixuna vírus, vírus Ross River, vírus Sagiyama, Una vírus, vírus da encefalite eqüina da Venezuela e vírus Whataroa.

- uma glicoproteína de envelope ('E') de um *flaviviridae*. *Flaviviridae* inclui Flavivírus, Pestivírus e
30 Hepacivírus. Vírus de interesse incluem vírus da dengue,

vírus da hepatite C, vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, vírus do oeste do nilo, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da diarreia bovina e vírus da encefalite de origem em carrapato (TBE).

5 - uma proteína de *bunyaviridae*. *Bunyaviridae* inclui os Buniavírus, Nairovírus, Flebovírus, Hantavírus, e Tospovírus. Vírus de interesse incluem buniavírus, vírus Bunyamwera, vírus da encefalite da Califórnia, vírus de La Cross, vírus Hantaan, vírus Sin Nombre, vírus da febre
10 hemorrágica da Criméia-Congo, vírus da febre *Sandfly Sicilian* e vírus da febre de *Rift valley*.

 - uma proteína de *arenaviridae*. *Arenaviridae* inclui vírus da coriomeningite linfocítica, vírus ipy e lassa vírus.

15 - uma proteína de *hepadnaviridae* (incluindo HBsAg). *Hepadnaviridae* inclui ortohepadnavírus e avihepadnavírus. Bem como vírus da hepatite B humana, essa família viral inclui vírus da hepatite B de esquilo da terra, vírus da hepatite B da marmota, vírus da hepatite B de woolly
20 monkey, vírus da hepatite B esquilo do ártico, vírus da hepatite B de pato, vírus da hepatite B de garça, e vírus da hepatite B de ganso Ross.

 - uma proteína de *herpesviridae*. *Herpesviridae* inclui os Simplexvírus, Varicellovírus, Roseolovírus,
25 Citomegalovírus, Muromegalovírus, Linfocriptovírus e Radinovírus. Vírus de interesse incluem o herpes vírus humano, incluindo Vírus do Herpes Simples (HSV), vírus Varicela-zoster (VZV), vírus de Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus (CMV), Herpesvírus Humano 6 (HHV6),
30 Herpesvírus Humano 7 (HHV7), e Herpesvírus Humano 8 (HHV8)

etc. Antígenos adequados podem ser selecionados de glicoproteínas gB, gC, gD e gH (por exemplo, em HSV). HSV gD2 é particularmente preferido.

- uma proteína de *Orthomyxoviridae*. *Orthomyxoviridae* inclui vírus influenza e vírus thogoto. Antígenos de vírus influenza são preferidos (vírus influenza A, B ou C), incluindo hemaglutinina de antígenos de superfície (HA) e/ou neuraminidase (NA).

Esses antígenos de superfície viral são tipicamente purificados pelo uso de tensoativos, e assim o componente antígeno pode incluir um tensoativo, particularmente de presente em uma forma particulada que inclui lipídeos.

A invenção é também útil com antígenos particulados baseados em proteínas híbridas ou de fusão que compreendem um antígeno de superfície viral e um antígeno heterólogo. Por exemplo, sabe-se como fundir a seqüência de HBsAg aos antígenos heterólogos para explorar a capacidade do HBsAg de montar partículas.

Por exemplo, a referência 63 relata fusões de HIV-1 gp120 a HBsAg para gerar uma proteína que se montou espontaneamente em partículas que se assemelham a partículas nativas de HBsAg em tamanho e densidade, consistentes com uma composição lipídica de cerca de 25% e um conteúdo de gp120 de cerca de 100 por partícula. O gp120 foi capaz de se dobrar em sua conformação nativa na fusão e reteve sua atividade biológica. De modo similar, epitopos de HIV gp41 foram melhorados ao fazer fusões internas com HBsAg, e a proteína de fusão auto-montada em partículas de lipoproteína de 22 nm [64].

Essa abordagem também foi usada para vacinas de

malária. A Referência 65 relata que epitopos de até 61aa do antígeno de malária gp190 foram inseridos na seqüência de HBsAg, e que as partículas híbridas expressas podem elicitar uma resposta imune anti-gp190 em animais. A

5 Referência 66 relata uma proteína que tem 16 repetições de uma seqüência de 4-mer da proteína de circunsporozoíta expresso como proteína de fusão com HBsAg. A Referência 67 relata a produção em levedura de partículas semelhantes a vírus compostas de Pfs16 fundido a HBsAg. A Referência 68

10 revela um antígeno híbrido em que a proteína de circunsporozoíta é fundida a HBsAg. A Referência 69 revela uma fusão da região C-terminal da proteína 1 de superfície de merozoíta de *P. vivax*, que formou partículas imunogênicas de 20-45 nm de tamanho. O uso de HBsAg para

15 apresentação de antígenos de malária em forma particulada de auto-montagem é portanto, bem conhecido na técnica.

Portanto, a invenção pode ser usada com antígenos híbridos que compreendem um antígeno de superfície viral e um antígeno heterólogo. O antígeno heterólogo pode ser

20 inserido na seqüência de antígeno de superfície viral, ou pode ser fundido ao N-terminal ou C-terminal da seqüência de antígeno de superfície viral. Se o antígeno de superfície viral nativo pode montar em partículas (por exemplo, HBsAg) então a inserção ou fusão não evitará essa

25 montagem.

Nessas proteínas híbridas, o antígeno heterólogo pode ser de uma bactéria, de um fungo, de um parasita, de um vírus (mas, por definição, o antígeno heterólogo não é HBsAg) etc. É possível incluir um antígeno heterólogo

30 completo na proteína híbrida, mas é mais usual incluir um

fragmento antigênico do antígeno.

Particularmente quando o antígeno de superfície viral é HBsAg, o antígeno heterólogo pode ser de HIV, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* ou *Plasmodium ovale*. Antígenos de HIV adequados para fazer híbridos de HBsAg incluem glicoproteína de envelope gp120 ou fragmentos antigênicos desses [63]. Antígenos adequados de *P.falciparum* para fazer híbridos de HBsAg podem ser baseados em uma subunidade do antígeno de superfície de circunsporozoíta ("CSP"), por exemplo, eles podem incluir entre 3 e 20 repetições de seu motivo NANP (Id de Seq. N°: 2), e/ou eles podem incluir a região C-terminal de CSP (mas tipicamente não incluindo os 12 aminoácidos finais do C-terminal). Por exemplo, a invenção pode usar o antígeno conhecido como "RTS", que contém uma grande porção do C-terminal de CSP de NF54 ou 7G8 isolado de *P. falciparum* (aminoácidos 210 a 398, que incluem 19 repetições NANP e a região de epítipo de célula T nos aminoácidos 367 a 390), fundido ao N-terminal de HBsAg em quatro aminoácidos da porção preS2 de HBsAg. Quando expresso em levedura, RTS forma partículas que incluem lipídeos (primariamente fosfolipídeo) em adição a proteína. A sequência de RTS pode assim conter: (i) um resíduo de metionina N-terminal; (ii) Met-Ala-Pro; (iii) 189 aminoácidos que correspondem aos aminoácidos 210-398 de proteína CS de *P.falciparum* 7G8 ou aos aminoácidos 207-395 de proteína CS de *P.falciparum* NF54; (iv) Arg ou Gly; (v) Pro-Val-Thr-Asn de proteína Pré-S2 de hepatite B; e (vi) HBsAg. do isolado 7G8, RTS de comprimento total tem a sequência dada como Id. de Seq. N°: 1 na referência 70 (veja também a Figura 5 da referência

‘

No segundo aspecto da invenção, a proporção de peso na composição do adjuvante graxo para o tensoativo do antígeno é menor que 1.000:1.

Para um adjuvante MF59, a proporção de peso é baseada na quantidade de esqualeno. Para uma composição que contém 0,1 µg/ml de tensoativo em um componente antígeno, a concentração de esqualeno será menor que 100 µg/ml. Para uma composição que contém 1 µg/ml de tensoativo em um componente antígeno, a concentração de esqualeno será menor que 1 mg/ml. Para uma composição que contém 10 µg/ml de tensoativo em um componente antígeno, a concentração de esqualeno será menor que 10 mg/ml, enquanto a concentração de esqualeno em uma composição típica de adjuvante MF59 seria de 43 mg/ml (ou seja, 4.300:1).

Para um adjuvante 3D-MPL, a proporção de peso é baseada na quantidade de total de 3D-MPL, ou seja, incluindo todas as formas diferentes de acil que podem estar presentes. Para uma composição que contém 0,1 µg/ml de tensoativo em um componente antígeno, a concentração total de 3D-MPL será menor que 100 µg/ml. Para uma composição que contém 1 µg/ml de tensoativo em um componente antígeno, a concentração total de 3D-MPL será menor que 1 mg/ml.

A proporção de 1.000:1 é uma máxima. Para também reduzir o potencial para interferência entre óleo em um adjuvante e tensoativo em um antígeno, a proporção pode ser reduzida. Assim a proporção pode ser ≤500:1, ≤400:1, ≤300:1, ≤200:1, ≤100:1, ≤50:1, ou ainda ≤25:1. Em uma proporção ≤100:1, a composição que contém 10 µg/ml de tensoativo em um componente antígeno deve ter um conteúdo

de óleo (por exemplo conteúdo de esqualeno ou 3D-MPL) de 1 mg/ml. Em uma proporção $\leq 25:1$, a composição que contém 10 $\mu\text{g/ml}$ de tensoativo em um componente antígeno deve ter um conteúdo de óleo (por exemplo conteúdo de esqualeno ou 3D-MPL) $\leq 250 \mu\text{g/ml}$; inversamente, a composição que compreende 100 $\mu\text{g/ml}$ de 3D-MPL deve ter não menos que 4 $\mu\text{g/ml}$ de tensoativo como parte do antígeno.

A proporção é preferivelmente maior que 1.5:1 por exemplo $\geq 2:1$, $\geq 2,5:1$, $\geq 3:1$, $\geq 4:1$, $\geq 5:1$ ou mais.

10 Para 3D-MPL, uma proporção entre 2,5:1 e 25:1 é preferida, mais preferivelmente entre 2,5:1 e 10:1, e ainda mais preferivelmente entre 2,5:1 e 5:1. Assim, a composição que contém 10 $\mu\text{g/ml}$ de tensoativo em um componente antígeno deve ter um conteúdo de 3D-MPL entre 25 $\mu\text{g/ml}$ e 250 $\mu\text{g/ml}$,
15 preferivelmente entre 25 $\mu\text{g/ml}$ e 100 $\mu\text{g/ml}$, e ainda mais preferivelmente entre 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$; inversamente, a composição que compreende 100 $\mu\text{g/ml}$ de 3D-MPL deve incluir um antígeno que tem um conteúdo de tensoativo entre 4 $\mu\text{g/ml}$ e 40 $\mu\text{g/ml}$, preferivelmente entre 10 $\mu\text{g/ml}$ e 40 $\mu\text{g/ml}$, e
20 ainda mais preferivelmente entre 20 $\mu\text{g/ml}$ e 40 $\mu\text{g/ml}$.

A composição imunogênica

Assim como possuindo antígeno e um adjuvante graxo (e, no segundo aspecto, um baixo nível de tensoativo), as composições da invenção podem compreender transportadores,
25 adjuvantes, excipientes, tampões etc., como descrito em maiores detalhes abaixo. Esses componentes não antigênicos podem ter várias fontes. Por exemplo, eles podem estar presentes em um dos materiais de antígeno ou adjuvante que serão usados durante a fabricação ou podem ser adicionados
30 separadamente daqueles componentes.

Composições preferidas da invenção incluem um ou mais transportadores e/ou excipientes farmacêuticos.

Para controlar a tonicidade, é preferível incluir um sal fisiológico, como um sal de sódio. Cloreto de sódio (NaCl) é preferido, que pode estar presente entre 1 e 20 mg/ml.

As composições terão geralmente uma osmolalidade entre 200 mOsm/kg e 400 mOsm/kg, preferivelmente entre 240-360 mOsm/kg, e estarão mais preferivelmente na faixa de 280-320 mOsm/kg. A osmolalidade foi previamente relatada como não tendo um impacto sobre a dor causada pela vacinação [72], mas manter a osmolalidade nessa faixa é, todavia, preferível.

As composições da invenção podem incluir um ou mais tampões. Tampões típicos incluem: um tampão de fosfato; um tampão Tris; um tampão de borato; um tampão de succinato; um tampão de histidina; ou um tampão de citrato. Tampões serão tipicamente incluídos na faixa de 5-50 mM, e preferivelmente na faixa de 5-20 mM.

O pH da composição da invenção será geralmente entre 5,0 e 7,5, e mais tipicamente entre 5,0 e 6,0 para estabilidade ótima, ou entre 6,0 e 7,0. O processo da invenção pode assim incluir uma etapa de ajuste do pH da vacina antes da embalagem dela em recipientes de dosagem. A vacina que contém toxóides diftéricos e tetânicos preferivelmente tem um pH ≥ 6 , para evitar o risco de reversão de toxicidade nos toxóides (particularmente no toxóide diftérico), e assim a vacina que contém toxóides e antígenos HBsAg têm preferivelmente um pH entre 6,0 e 7,0. para outras vacinas, incluindo vacinas monovalentes de

HBsAg, um pH <6 pode ser aceitável.

As composições da invenção são preferivelmente estéreis.

As composições da invenção são preferivelmente não
5 pirogênicas, por exemplo, contendo <1 EU (unidade de endotoxina, uma medida padrão) por dose, e preferivelmente <0,1 EU por dose.

As composições da invenção são preferivelmente livres de glúten.

10 Se HBsAg absorvido é usado, o produto da vacina final pode ser uma suspensão com uma aparência turva. Essa aparência significa que contaminação microbiana não é facilmente visível, e assim a vacina preferivelmente contém um agente antimicrobiano. Isso é particularmente importante
15 quando a vacina é embalada em recipientes de multidose. Conservantes preferidos para inclusão são 2-fenoxietanol e/ou timerosal. É recomendado, no entanto, não usar conservantes mercuriais durante o processo da invenção, embora timerosal seja encontrado em várias vacinas de HBV
20 existentes. Para segurança, no entanto, é preferível que a composição final contenha menos que cerca de 25 ng/ml de mercúrio. Mais preferivelmente, o produto da vacina final não deve conter timerosal detectável. Isso será geralmente atingido por remoção do conservante mercurial de uma
25 preparação de antígeno antes de sua adição no processo da invenção ou ao evitar o uso de timerosal durante a preparação dos componentes usados para fazer a composição. HBsAg pode ser submetido a diálise (por exemplo, como cisteína) para remover quaisquer conservantes mercuriais
30 como timerosal que pode ter sido usado durante a preparação

do HBsAg [73,74].

Durante a fabricação, a diluição dos componentes para gerar concentrações finais desejadas será comumente realizada com WFI (água para injeção).

5 A concentração de qualquer fosfato de alumínio na composição da invenção, expressa em termos de Al_3^+ , é preferivelmente menos que 5 mg/ml por exemplo ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml etc.

10 A concentração de HBsAg na composição da invenção é preferivelmente menos que 100 μ g/ml, por exemplo, ≤ 90 μ g/ml, ≤ 80 μ g/ml, ≤ 70 μ g/ml, ≤ 65 μ g/ml, ≤ 60 μ g/ml, ≤ 55 μ g/ml, ≤ 50 μ g/ml, ≤ 45 μ g/ml, ≤ 40 μ g/ml etc. A concentração de cerca de 40 μ g/ml ou cerca de 20 μ g/ml é típica.

15 As composições da invenção são preferivelmente administradas a pacientes em doses de 0,5 ml. Referências a doses de 0,5 ml doses devem incluir variância normal, por exemplo, 0,5 ml $\pm$ 0,05 ml.

20 A invenção pode fornecer material volumoso que é adequado para embalagem em doses individuais, que ser então distribuído para administração a pacientes. As concentrações acima mencionadas são tipicamente concentrações em dose embalada final, e assim, concentrações em vacina de volume podem ser maiores (por exemplo, para serem reduzidas às concentrações finais por
25 diluição).

As composições da invenção estarão geralmente em forma aquosa.

Embalagem das composições da invenção

30 Depois da combinação do antígeno e adjuvante, os processos da invenção podem compreender uma etapa de

extração e embalagem de uma amostra de 0,5 ml da mistura em um recipiente. Para situações de multidoses, quantidades de múltiplas doses serão extraídas e embaladas juntas em um único recipiente. Como acima mencionado, em um arranjo
5 alternativo o antígeno e adjuvante são embalados separadamente, para mistura extemporânea no momento do uso.

Os processos da invenção podem compreender a etapa adicional de embalagem da vacina em recipientes para uso. Recipientes adequados incluem frascos e seringas
10 descartáveis (preferivelmente estéreis).

Quando a composição da invenção é embalada em frascos, esses são preferivelmente feitos de vidro ou de um material plástico. O frasco é preferivelmente esterilizado antes da composição ser adicionada a ele. Para evitar problemas com
15 pacientes sensíveis ao látex, os frascos são preferivelmente selados com uma tampa livre de látex. O frasco pode incluir uma única dose de vacina, ou ele pode incluir mais de uma dose (um frasco de 'multidoses'), por exemplo, 10 doses. Quando do uso de um frasco de multidoses,
20 cada dose deve ser retirada com uma agulha e seringa estéreis e sob condições assépticas estritas, tomando cuidado para evitar a contaminação do conteúdo do frasco. Frascos preferidos são feitos de vidro incolor.

Um frasco pode ter uma tampa (por exemplo, um fecho de
25 Luer) adaptada de modo que uma seringa pré-preenchida possa ser inserida na tampa, o conteúdo da seringa pode ser expelido no frasco, e o conteúdo do frasco pode ser removido de volta para a seringa. Após a remoção da seringa do frasco, uma agulha pode ser então anexada e a composição
30 pode ser administrada a um paciente. A tampa é

preferivelmente localizada dentro de uma cobertura ou selo, de modo que a cobertura ou selo tenha que ser removido antes da tampa poder ser acessada.

Quando a composição é embalada em uma seringa, o que é preferível, a seringa não terá normalmente uma agulha anexada a ela, embora uma agulha separada possa ser suprida com a seringa para montagem e uso. Agulhas de segurança são preferidas. Agulhas de 1 polegada (2,54 cm) calibre 23, 1 polegada calibre 25 e 5/8 polegadas (1,3 cm) calibre 25 são típicas. As seringas pode ser fornecidas com rótulos destacáveis em que o número do lote e data de validade do conteúdo podem ser impressos, para facilitar a estocagem. O êmbolo em uma seringa preferivelmente tem um tampo para evitar que o êmbolo seja acidentalmente removido durante a aspiração. Um tampo de êmbolo de borracha de butil é preferido. As seringas podem ter uma tampa de borracha de látex e/ou tampo. Seringas descartáveis contêm uma única dose da vacina. A seringa terá geralmente uma tampa de ponta para selar a ponta antes da anexação de uma agulha, e a tampa de ponta é preferivelmente feita de borracha de butil. Se a seringa e agulha são embaladas separadamente, então a agulha é preferivelmente ajustada com um protetor de borracha de butil. Borracha de butil cinza é preferida. As seringas preferidas são aquelas comercializadas sob o nome comercial "Tip-Lok"TM.

Quando um recipiente de vidro (por exemplo uma seringa ou a frasco) é usado, então é preferível usar um recipiente feito de um vidro de borossilicato em vez de um vidro de cal de soda.

Depois da composição ser embalada em um recipiente, o

recipiente pode ser então colocado em uma caixa para distribuição, por exemplo, dentro de uma caixa de cartolina, e a caixa será rotulada com detalhes da vacina, por exemplo, seu nome comercial, uma lista dos antígenos na
5 vacina (por exemplo "hepatite B recombinante" etc.), o recipiente de apresentação (por exemplo "Seringas Tip-Lok Descartáveis pré-preenchidas" ou "frascos de dose única de 10 x 0,5 ml"), sua dose (por exemplo "cada um contendo uma dose de 0,5ml"), recomendações (por exemplo "para uso
10 adulto apenas" ou "para uso Pediátrico apenas"), uma data de validade, uma indicação (por exemplo "imunização ativa contra infecção por vírus da hepatite B (HBV) causada por todos os subtipos conhecidos para pacientes com insuficiência renal (incluindo pacientes de pré-hemodiálise
15 e hemodiálise), de idade de 15 anos adiante" etc.), um número de patente etc. Cada caixa deve conter mais de uma vacina embalada, por exemplo, cinco ou dez vacinas embaladas (particularmente para frascos). Se a vacina é contida em uma seringa então a caixa deve mostrar um
20 retrato da seringa.

A vacina pode ser distribuída junto (por exemplo, na mesma caixa) com uma bula que contém detalhes da vacina, por exemplo, instruções para administração, detalhes do antígenos na vacina etc. as instruções também podem conter
25 advertências, por exemplo, para manter uma solução de adrenalina pronta disponível em caso de reação anafilática após a vacinação etc.

A vacina embalada é preferivelmente estocada entre 2°C e 8°C. Ela deve não ser congelada.

30 **Métodos de tratamento e Administração da vacina**

As composições da invenção são adequadas para administração a pacientes humanos, e a invenção fornece um método de despertar uma resposta imune em um paciente, que compreende a etapa de administração da composição da
5 invenção ao paciente.

A invenção também fornece a composição da invenção para uso em medicina.

A invenção também fornece o uso de (i) um antígeno purificado substancialmente na ausência de tensoativo e
10 (ii) um adjuvante graxo, na fabricação de um medicamento para administração ao paciente.

A invenção também fornece o uso de (i) um componente antígeno que inclui um tensoativo e (ii) um adjuvante graxo, na fabricação de um medicamento para administração
15 ao paciente, em que a proporção de peso do adjuvante graxo em (ii) para tensoativo em (i) é menor que 1.000:1.

As composições imunogênicas da invenção são preferivelmente vacinas, por exemplo, para uso na prevenção e/ou tratamento de infecção por vírus da hepatite B.
20 Pacientes que receberam composições da invenção preferivelmente têm um título sérico anti-HBsAg GM ≥ 500 mIU/ml, medido 6 semanas depois da primeira imunização. Mais preferivelmente, o título é ≥ 500 mIU/ml, quando medido depois de 12 meses.

25 As composições são particularmente úteis para proteção contra e/ou tratamento de infecções por vírus da hepatite B em pacientes para os quais as vacinas de adjuvante existentes (como o produto ENGERIX BTM) são ineficazes. Subgrupos de pacientes para os quais as composições são
30 particularmente adequadas incluem: pacientes

imunocomprometidos; pacientes em hemodiálise; pacientes em pré-hemodiálise; pacientes com insuficiência renal; pacientes com falência renal; pacientes com falência renal precoce antes de necessitarem hemodiálise; pacientes que
5 esperam por transplante de fígado, por exemplo, em listas de espera; pacientes com falência renal de estágio final; pacientes que receberam um transplante de órgão (particularmente um transplante de fígado), por exemplo, no período de 6 meses que precede a primeira dose da vacina da
10 invenção; pacientes que recebem (ou receberam, por exemplo, no período de 6 meses que precede a primeira dose da vacina da invenção) tratamento com imunoglobulina para hepatite B (HBIG); pacientes com um haplótipo HLA DQ2 [75]; pacientes com um haplótipo HLA DR3 [75]; pacientes com um haplótipo
15 HLA DR7 [75]; pacientes com o alelo de HLA DQB1*0202 [76]; pacientes infectados com HIV; portadores crônicos de HBV; pacientes que receberam recentemente transfusão sanguínea; pacientes que receberam medicamentos imunossupressores; pacientes que sofrem de AIDS; pacientes com ascite;
20 pacientes com cirrose; pacientes com encefalopatia; pacientes que recebem terapia com interferon, e em particular ifn- α ; pacientes que fumam cigarros; pacientes que fumam charutos; pacientes com um índice de massa corporal ≥ 30 kg/m²; e pacientes que receberam uma vacina de
25 HBsAg mas não foram soroconvertidos (por exemplo, eles têm um título sérico anti-HBsAg < 10 mIU/ml após um esquema de dosagem padrão primário, como 3 doses de ENGERIX BTM).

Esses pacientes podem ter uma taxa de clearance de creatinina menor que 30 ml/min (a faixa saudável normal
30 sendo ~100-140 ml/min em homens e 90-130 ml/min em

mulheres). Os pacientes têm preferivelmente pelo menos 15 anos de idade, por exemplo, entre 15-40 anos, entre 15-60 anos, entre 40-60 anos, ou mesmo acima de 60. Os pacientes com mais de 55 podem ser tratados a despeito de qualquer
5 doença subjacente.

As composições da invenção podem ser administradas por injeção intramuscular, por exemplo, no deltóide.

Quando as composições da invenção incluem um adjuvante baseado em alumínio, um depósito dos componentes pode
10 ocorrer durante a estocagem. A composição deve ser, portanto, agitada antes da administração a um paciente. a composição agitada será uma suspensão branca.

Processos preferidos e vacinas da invenção

Um processo preferido para a preparação de uma
15 composição imunogênica compreende as etapas de combinação de (i) um componente HBsAg que inclui polisorbato 20 e (ii) um componente adjuvante que compreende 3D-MPL adsorvido a um fosfato de alumínio, para gerar uma composição em que a proporção de peso de 3D-MPL para polisorbato 20 é menor que
20 1.000:1.

Uma composição imunogênica preferida é uma em que: (a) a composição compreende HBsAg, polisorbato 20, 3D-MPL e um adjuvante de fosfato de alumínio; e (b) a proporção de peso do 3D-MPL para polisorbato 20 é menor que 1.000:1. O 3D-MPL
25 e o HBsAg são preferivelmente adsorvidos ao fosfato de alumínio. A concentração de HBsAg é de cerca de 40 µg/ml. A concentração de 3D-MPL é cerca de 100 µg/ml. A concentração de Al_3^+ é cerca de 1 mg/ml.

Uma outra composição preferida da invenção compreende
30 (i) HBsAg, purificado de *S.cerevisiae*, e (ii) um adjuvante

que compreende uma mistura de fosfato de alumínio e 3D-MPL. A concentração de HBsAg é de cerca de 40 µg/ml. A concentração de 3D-MPL é cerca de 100 µg/ml. A concentração de Al_3^+ é cerca de 1 mg/ml. HBsAg inclui polisorbato 20, e a proporção de peso óleo:tensoativo (ou seja, a proporção de peso de 3D-MPL:polisorbato 20) é entre 2,5:1 e 100:1 ou seja, o polisorbato 20 está presente em um nível entre 1 µg/ml e 40 µg/ml (ou seja, entre 2,5 µg e 100 µg de polisorbato 20 por 100 µg de HBsAg). A proporção é preferivelmente entre 2,5:1 e 25:1 ou seja, o polisorbato 20 está presente em um nível entre 4 µg/ml e 40 µg/ml. O 3D-MPL e o HBsAg são ambos adsorvidos ao fosfato de alumínio.

Geral

O termo "que compreende" engloba "que inclui" bem como "que consiste", por exemplo, uma composição "que compreende" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

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

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

A menos que especificamente determinado, um processo que compreende uma etapa de mistura de dois ou mais componentes não requer qualquer ordem específica de mistura. Assim, componentes podem ser misturados em qualquer ordem. Quando há três componentes então dois

componentes podem ser combinados um com o outro e então a combinação pode ser combinada com o terceiro componente etc. Como acima descrito, os componentes podem ser misturados durante a fabricação ou extemporaneamente no momento do uso.

Quando um antígeno é descrito com sendo "adsorvido" a um adjuvante, é preferível que pelo menos 50% (em peso) daquele antígeno seja adsorvido, por exemplo, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou mais. É preferível que HBsAg seja totalmente adsorvido, ou seja, nenhum seja detectável no sobrenadante.

Quando materiais animais (e particularmente bovino) são usados na cultura de células, eles devem ser obtidos de fontes que sejam livres de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs), e em particular livres de encefalopatia espongiforme bovina (BSE).

Borrachas de butil incluem borrachas de clorobutil e bromobutil.

Deve ser percebido que grupos ionizáveis podem existir na forma neutra mostrada nas fórmulas nessa, ou podem existir em forma carregada, por exemplo, dependendo do pH. Portanto, um grupo fosfato pode ser mostrado como $-P-O-(OH)_2$, essa fórmula é meramente representativa do grupo fosfato neutro, e outras formas carregadas são englobadas pela invenção. De modo similar, anéis de açúcar podem existir em forma aberta e fechada e, embora formas fechadas sejam mostradas em fórmulas estruturais nessa, formas abertas são também englobadas pela invenção.

Modos para realizar a invenção

Três diferentes preparações de HBsAg foram estudadas:

- HBsAg expresso em células de *S.cerevisiae*, purificado com o uso de tensoativo não iônico.

- HBsAg expresso em células de levedura *Hanensula*, purificado com o uso de tensoativo não iônico.

5 - HBsAg expresso em células CHO, com sequência preS2, purificado sem o uso de tensoativos.

Dois diferentes adjuvantes foram estudados:

- Hidróxido de alumínio (1 mg/ml)

- MF59 em tampão de citrato (13 mM)

10 Seis formulações foram preparadas, cada um com 20 µg/ml de HBsAg, 0,15M NaCl e 0,01% mertiolate:

	A	B	C	D	E	F
HBsAg	CHO	CHO	<i>Hanensula</i>	<i>Hanensula</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.cerevisiae</i>
Adjuvante	Al Hidrox	MF59	Al Hidrox	MF59	Al Hidrox	MF59
NaCl	0,15M	0,15 M	0,15M	0,15M	0,15M	0,15M
Mertiolate	0,01%	0,01 %	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
Tensoativo	—	—	+	+	+	+

MF59 foi relatado por melhorar a resposta de anticorpo em primatas a HBsAg recombinante [77]. As formulações A a D foram usadas para imunizar macacos *african green*. Grupos de 15 6 macacos foram imunizados por via intramuscular no dia 0 e dia 28. Sangue foi coletado no tempo 0 e então a cada 2 semanas até a semana 8, e os títulos de anti-HBsAg (GMT) foram medidos por ELISA. Os títulos foram normalizados a 1,0, que foi o valor do dia 14 em cada grupo, e os 20 resultados normalizados foram como se segue:

	A	B	C	D
--	---	---	---	---

Hospedeiro	CHO	CHO	Levedura	levedura
Adjuvante	Al Hidrox	MF59	Al Hidrox	MF59
Tensoativo	—	—	+	+
Dia 14	1,0	1,0	1,0	1,0
Dia 28	0,9	0,8	1,3	0,4
Dia 42	19,2	159,8	108,8	85,2
Dia 56	10,8	32,6	61,3	24,5

Observando os títulos do dia 42 e dia 56, esses dados mostram que o adjuvante MF59 aumentou os títulos muito mais marcadamente que o adjuvante de alumínio para antígeno expresso em CHO (aumento de 160 vezes vs. aumento de 20 vezes no dia 42), mas a situação foi revertida para o antígeno expresso em *Hanensula* (aumento de 85 vezes vs. aumento de 110 vezes no dia 42).

Experimentos similares foram realizados em babuínos, com o uso das formulações B, E e F. Os valores de GMT foram medidos 14 dias após a primeira injeção e, em relação ao valor do grupo F, como se segue:

	A	B	E	F
Tensoativo	—	—	+	+
Adjuvante	Al Hidrox	MF59	Al Hidrox	MF59
Dia 14	-	13,5	4,5	1,0

Aqui, o uso de MF59 em vez do adjuvante de alumínio leva a uma resposta menor de GMT (comparar grupos E e F), enquanto um aumento deva ser esperado (grupo B e referência 77).

As respostas de anti-HBsAg 28 depois da primeira injeção com o uso das formulações E e F foram também comparadas em macacos rhesus, macacos *african green* e camundongos C3H (NB: camundongos receberam 60% da dose de

HBsAg). Bem como medindo os valores de GMT, o número daqueles que respondem foi também medido, ou seja, animais que mostram um título >10 mIU/ml. Os resultados, normalizados ao grupo F, foram como se segue:

	GMT		Respondem	
	E	F	E	F
Adjuvante	Al Hidrox	MF59	Al Hidrox	MF59
Rhesus	4,2	1,0	60%	20%
AGM	110,0	1,0	100%	50%
camundongo	0,1	1,0	94%	100%

5 Em contraste a camundongos, portanto, o uso de MF59 como o adjuvante em primatas resultou em uma diminuição substancial tanto em valores de GMT quanto nos níveis dos que respondem para o HBsAg expresso em *S. cerevisiae*.

Finalmente, o aumento em GMT que resulta de vacinação de reforço com as formulações E e F foi medido em macacos 10 *african green* soro-positivos. Os títulos foram medidos antes da dose de reforço e então novamente 28 dias depois, e o aumento em títulos foi como se segue:

Grupo	Adjuvante	Aumento (x)
E	Al Hidrox	91,5 x
F	MF59	19,1 x

Bem como dando um menor aumento em vezes que o 15 adjuvante de hidróxido de alumínio, MF59 gerou um menor valor de GMT 28 dias após a dose de reforço.

No geral, portanto, MF59 parece ser um pior adjuvante que hidróxido de alumínio para HBsAg expresso em levedura em primatas, mas um melhor adjuvante para HBsAg expresso em 20 CHO. Esses resultados podem ser explicados por uma interação entre (a) tensoativo residual em HBsAg purificado

de levedura e (b) excesso de óleo de esqualeno no adjuvante de MF59. Como um óleo, esqualeno é submetido à ação de tensoativos em condições aquosas, e vice versa, e é proposto que o tensoativo no antígeno seja incompatível com o óleo no adjuvante. Essa incompatibilidade pode ser solucionada com purificação do HBsAg sem o uso de detergentes (por exemplo, como no material expresso em CHO), ou ao assegurar que o óleo não esteja presente em um tal excesso que ele interfira com o tensoativo no antígeno.

Em uma composição de HBsAg com adjuvante MF59, um volume de MF59 é combinado com um volume de solução de antígeno. Em um volume de 100 ml, haverá assim, 50 ml de MF59 e 50 ml de HBsAg em solução. Esses 100 ml contêm 2,15 g esqualeno do MF59 e , e uma concentração de HBsAg de 40 µg/ml, eles contêm 2 mg de HBsAg. Em uma concentração de polisorbato 20 de 25 µg por 100 µg de HBsAg [35], os 100 ml contêm 0,5 mg de polisorbato 20. A proporção óleo:tensoativo em uma vacina típica de adjuvante MF59 é assim 4.300:1. Por redução do excesso de óleo para menos que 1.000:1, a interação entre óleo no adjuvante e tensoativo no antígeno pode ser substancialmente reduzida, dessa forma reduzindo a interferência.

Deve ser compreendido que a invenção foi descrita apenas por via de exemplo e que podem ser feitas modificações, embora permanecendo dentro do escopo e espírito da invenção.

REFERÊNCIAS (cujos conteúdos são aqui incorporados por referência)

[1] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 de *Methods in Molecular Medicine*

series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

[2] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

5 [3] WO90/14837.

[4] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.

[5] Patente US 6.299.884.

[6] Patente US 6.451.325.

10 [7] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.

[8] Hariharan e cols. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.

[9] WO95/11700.

[10] Patente US 6.080.725.

[11] WO2005/097181.

15 [12] Pedido de patent UK GB-A-2220211.

[13] Myers e cols. (1990) páginas 145-156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.

[14] Ulrich (2000) capítulo 16 (páginas 273-282) da referência 1.

20 [15] Johnson e cols. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.

[16] Baldrick e cols. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.

[17] WO 94/21292.

[18] WO94/00153.

25 [19] WO97/01640/

[20] WO96/26741.

[21] WO93/19780.

[22] Patente US 6.375.945.

[23] WO00/00462.

30 [24] Meraldi e cols. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.

- [25] Pajak e cols. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [26] Brandenburg e cols. (2000) *Eur J Biochem* 267 :3370-7.
- [27] Johnson e cols. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- 5 [28] Evans e cols. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [29] Patente US 6.764.840.
- [30] Pedido de Patente US 2005/0107600.
- [31] Lien e cols. (2001) *J. Biol. Chem* 276:1873-80.
- [32] WO03/011223.
- 10 [33] Wong e cols. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [34] US2005/0215517.
- [35] Costa e cols. (1997) *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* v.39 n.1 São Paulo Ene.
- [36] Vanlandschoot e cols. (2005) *J Gen Virol* 86:323-31.
- 15 [37] Hilleman (1993) páginas 17-40 de *Hepatitis B Vaccines in clinical practice* ISBN 0-8247-8780-3.
- [38] GerM e cols. (1969) *J Virol* 4:763.
- [39] GerM e cols. (1969) *J Virol* 7:569.
- [40] Siebke e cols. (1972) *Acta Pathol Microbiol Scan sect*
- 20 B 80:935.
- [41] Pillot e cols. (1976) *J Clin Microbiol* 4:205.
- [42] Duimel & Krijnen (1972) *Vox Sang* 23:249.
- [43] Neurath e cols. (1974) *PNAS USA* 71:2663.
- [44] Charm & Wong (1975) *Biotechnol Bioeng* 16:593.
- 25 [45] Patente US 4.857.317.
- [46] Patente US 4.683.294.
- [47] Houwen e cols. (1975) *J Immunol Methods* 8:185.
- [48] Sitrin e cols. (1993) páginas 83-101 de *Hepatitis B Vaccines in clinical practice* ISBN 0-8247-8780-3.
- 30 [49] Wampler e cols. (1985) *PNAS USA* 82:6830-4.

- [50] Chi e cols. (1994) *Ann N Y Acad Sci* 721:365-73.
- [51] Agraz e cols. (1994) *J Chromatogr A* 672:25-33.
- [52] Mason e cols. (1992) *PNAS USA* 89:11745-9.
- [53] Deml e cols. (1999) *J Virol Methods* 79:205-17.
- 5 [54] Ibarra e cols. (1999) *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 735:271-7.
- [55] WO90/10058.
- [56] Pedido de patente Japonesa JP63239234.
- [57] Patente US 4.694.074.
- 10 [58] EP-0341733.
- [59] Patente US 5.242.812.
- [60] Pedido de patente Russa RU-2128707.
- [61] Hardy e cols. (2000) *J Biotechnol* 77:157-67.
- [62] Dogan e cols. (2000) *Biotechnol Bioeng* 69:435-41.
- 15 [63] Berkower e cols. (2004) *Virology* 321(1):75-86.
- [64] Eckhart e cols. (1996) *J Gen Virol* 77:2001-8.
- [65] von Brunn e cols. (1991) *Vaccine* 9(7):477-84.
- [66] Vreden e cols. (1991) *Ain J Trop Med Hyg* 45(5):533-8.
- [67] Moelans e cols. (1995) *Mol Biochem Parasitol* 72(1-
20 2):179-92.
- [68] Stoute e cols. (1997) *N Engl J Med* 336(2):86-91.
- [69] Wunderlich & del Portillo (2000) *Mol Med* 6(3):238-45.
- [70] Patente US 5.928.902
- [71] WO93/10152.
- 25 [72] Nony e cols. (2001) *Vaccine* 19:3645-51.
- [73] WO02/12287.
- [74] WO03/066094.
- [75] Desombere e cols. (1998) *Tissue Antigens* 51:593-604.
- [76] McDermott e cols. (1997) *Tissue Antigens*. 50:8-14.
- 30 [77] Traquina e cols. (1996) *J Infect Dis* 174:1168-75.

Listagem de Seqüência

<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS SRL
 CONTORNI Mario
 <120> **Redução de interferência entre adjuvantes que contêm óleo e
 antígenos que contêm tensoativos**
 <130> P041598W0
 <140> PCT/IB2006/444444
 <141> 02/08/2006
 <150> GB-0515906.6
 <151> 02/08/2005
 <150> GB-0522599.0
 <151> 04/11/2005
 <150> GB-0523923.1
 <151> 24/11/2005
 <160> 2
 <170> SeqWin991 versão 1.02
 <210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum
 <400> 1
 Asn Ala Asn Pro
 1
 <210> 2
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum
 <400> 2
 Met Met Ala Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 1 5 10 15
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 20 25 30
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 35 40 45
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 50 55 60
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 65 70 75 80
 Asn Pro Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro
 85 90 95
 Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Asn Ala Asn Asn Ala Val
 100 105 110
 Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr

115				120				125							
Leu	Lys 130	Lys	Ile	Lys	Asn	Ser 135	Ile	Ser	Thr	Glu	Trp 140	Ser	Pro	Cys	Ser
Val 145	Thr	Cys	Gly	Asn	Gly 150	Ile	Gln	Val	Arg	Ile 155	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala 160
Asn	Lys	Pro	Lys	Asp 165	Glu	Leu	Asp	Tyr	Glu 170	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys 175	Lys
Ile	Cys	Lys	Met 180	Glu	Lys	Cys	Ser	Ser 185	Val	Phe	Asn	Val	Val 190	Asn	Ser
Arg	Pro	Val 195	Thr	Asn	Met	Glu	Asn 200	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe 205	Leu	Gly	Pro
Leu	Leu 210	Val	Leu	Gln	Ala	Gly 215	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr 220	Arg	Ile	Leu	Thr
Ile 225	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp 230	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser 235	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly 240
Gly	Ser	Pro	Val	Cys 245	Leu	Gly	Gln	Asn	Ser 250	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser 255	Asn
His	Ser	Pro	Thr 260	Ser	Cys	Pro	Pro	Ile 265	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg 270	Trp	Met
Cys	Leu	Arg 275	Arg	Phe	Ile	Ile	Phe 280	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu 285	Leu	Cys	Leu
Ile	Phe 290	Leu	Leu	Val	Leu	Leu 295	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met 300	Leu	Pro	Val	Cys
Pro 305	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser 310	Thr	Thr	Thr	Asn	Thr 315	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr 320
Cys	Thr	Thr	Pro	Ala 325	Gln	Gly	Asn	Ser	Met 330	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys 335	Cys
Thr	Lys	Pro	Thr 340	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr 345	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro 350	Ser	Ser
Trp	Ala	Phe 355	Ala	Lys	Tyr	Leu	Trp 360	Glu	Trp	Ala	Ser	Val 365	Arg	Phe	Ser
Trp	Leu 370	Ser	Leu	Leu	Val	Pro 375	Phe	Val	Gln	Trp	Phe 380	Val	Gly	Leu	Ser
Pro 385	Thr	Val	Trp	Leu	Ser 390	Ala	Ile	Trp	Met	Met 395	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro 400
Ser	Leu	Tyr	Ser	Ile 405	Val	Ser	Pro	Phe	Ile 410	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile 415	Phe
Phe	Cys	Leu	Trp 420	Val	Tyr	Ile									

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de uma composição imunogênica caracterizado pelo fato de compreender as etapas de combinação de (i) um componente antígeno que
5 inclui um tensoativo e (ii) um componente adjuvante graxo, para gerar uma composição em que a proporção de peso entre o adjuvante graxo e o tensoativo é menor que 1.000:1.

2. Composição imunogênica caracterizada pelo fato de que: (a) a composição compreende um componente antígeno e
10 um componente adjuvante graxo; (b) o componente antígeno inclui um tensoativo; e (c) a proporção de peso entre o adjuvante graxo e o tensoativo é menor que 1.000:1.

3. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o
15 adjuvante graxo compreende um óleo metabolizável.

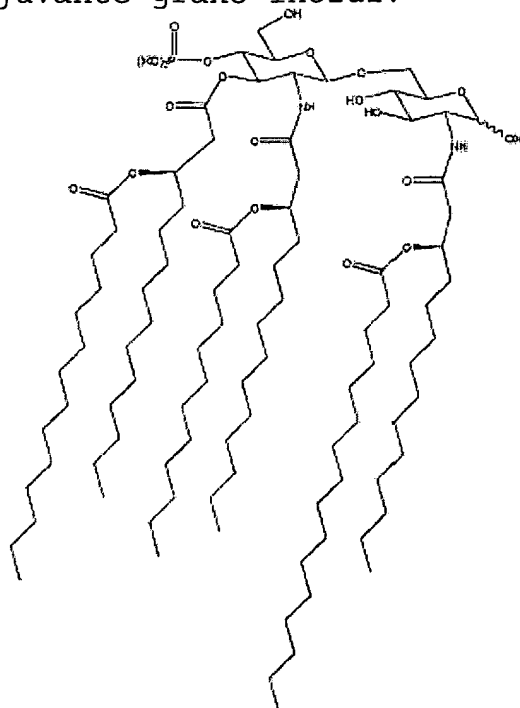
4. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o adjuvante graxo compreende uma emulsão óleo em água submicrométrica de esqualeno e polisorbato 80.

20 5. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o adjuvante graxo compreende uma molécula que compreende uma porção de ácido graxo.

6. Processo ou composição, de acordo com a
25 reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o adjuvante graxo é um monofosforil lipídeo A 3-desoxiacilado ("3D-MPL").

7. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o 3D-MPL é
30 uma mistura de moléculas que variam em sua acilação.

8. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 6 ou reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o adjuvante graxo inclui:



9. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o 3D-MPL está na forma de partículas.

10. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que as partículas podem ser esterilizadas em filtro.

11. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que o 3D-MPL está em combinação com um sal de alumínio.

12. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o sal de alumínio é um fosfato de alumínio.

13. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o 3D-MPL é adsorvido no sal de alumínio.

14. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é um éster de polioxietileno sorbitano.

5 15. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o éster é polisorbato 20.

16. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que a
10 concentração de tensoativo é de não mais que 50 µg/ml.

17. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o antígeno é um antígeno de superfície viral.

15 18. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o antígeno é um antígeno de superfície de hepatite B particulado ('HBsAg'), purificado na presença de tensoativo.

19. Processo ou composição, de acordo com a
20 reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o HBsAg está expresso em uma célula de levedura.

20. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a levedura é *Saccharomyces cerevisiae*.

25 21. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18, 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o HBsAg é não glicosilado e/ou inclui fosfatidilinositol.

22. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma
30 das reivindicações 18, 19, 20 ou 21, caracterizado pelo

fato de que o HBsAg é de subtipo adw2 do vírus da hepatite B.

23. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 5 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que o antígeno é uma proteína híbrida que compreende um antígeno de superfície viral e um antígeno heterólogo.

24. Processo ou composição, de acordo com a 10 reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o antígeno de superfície viral é HBsAg e o antígeno heterólogo é um antígeno de malária.

25. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a proteína 15 híbrida compreende HBsAg e um fragmento da proteína de circunsporozoíta de *Plasmodium falciparum*.

26. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a proteína híbrida compreende uma porção C-terminal de uma proteína de 20 circunsporozoíta de *Plasmodium falciparum*, quatro ou mais repetições acopladas (*tandem*) da região imunodominante da proteína de circunsporozoíta e HBsAg.

27. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 25 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26, caracterizado pelo fato de que a proporção de peso entre o adjuvante graxo e o tensoativo é menor que 500:1.

28. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 30 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26

ou 27, caracterizado pelo fato de que a proporção de peso entre o adjuvante graxo e o tensoativo é menor que 50:1.

29. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que o adjuvante graxo é um 3D-MPL e a proporção de peso entre o adjuvante graxo e o tensoativo é entre 2,5:1 e 25:1.

30. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que a composição tem uma osmolalidade entre 200 mOsm/kg e 400 mOsm/kg.

31. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que a composição inclui um tampão de fosfato.

32. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31, caracterizado pelo fato de que a composição tem um pH entre 6,0 e 7,0.

33. Uso de (i) um componente antígeno que inclui um tensoativo e (ii) um adjuvante graxo caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para administração ao paciente, em que a proporção de peso entre o adjuvante graxo em (ii) e o tensoativo em (i) é menor que 1.000:1.

34. Processo para a preparação de uma composição

imunogênica caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de combinação de (i) um componente HBsAg que inclui polisorbato 20 e (ii) um componente adjuvante que compreende 3D-MPL adsorvido em um fosfato de alumínio, para
5 gerar uma composição em que a proporção de peso entre 3D-MPL e polisorbato 20 é menor que 1.000:1.

35. Composição imunogênica caracterizada pelo fato de que: (a) a composição compreende HBsAg, polisorbato 20, 3D-MPL e um adjuvante de fosfato de alumínio; e (b) a
10 proporção de peso entre 3D-MPL e polisorbato 20 é menor que 1.000:1.

36. Processo para a preparação de uma composição imunogênica caracterizado pelo fato de que: (a) a composição compreende um antígeno e um adjuvante graxo; e
15 (b) o antígeno é substancialmente purificado na ausência de tensoativo.

Pt 0614254-0

REDUÇÃO DE INTERFERÊNCIA ENTRE ADJUVANTES CONTENDO ÓLEO E
ANTÍGENOS CONTENDO TENSOATIVOS

A inclusão de adjuvantes graxos em composições de vacina pode causar dificuldades com certos componentes antigênicos, particularmente com antígenos que incluem um componente tensoativo. Um método para a preparação de uma composição imunogênica que compreende um antígeno e um adjuvante graxo envolve a purificação do antígeno substancialmente na ausência de tensoativo. Quando tensoativos não podem ser evitados, os seguintes são combinados: (i) um componente antígeno que inclui um tensoativo e (ii) um componente adjuvante graxo, para gerar uma composição em que a proporção de peso entre o referido adjuvante graxo e o referido tensoativo é menor que 1.000:1.