

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

(22) Data de pedido: 2004.07.15	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L. VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA (SI)	IT
(30) Prioridade(s): 2003.07.15 GB 0316560		
(43) Data de publicação do pedido: 2006.04.12	(72) Inventor(es): ROBERTO OLIVIERI FABIO SABBATINI ILIO MARSILI	IT IT IT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.08.24 202/2011	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ULTRAFILTRAÇÃO E ULTRACENTRIFUGAÇÃO PARA A PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA**

(57) Resumo:

EM VEZ DE UMA ETAPA DE CENTRIFUGAÇÃO DURANTE A PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVS) A PARTIR DE BACTÉRIAS, A INVENÇÃO UTILIZA ULTRAFILTRAÇÃO. ISTO PERMITE QUE QUANTIDADES MUITO MAIORES DE SOBRENADANTE CONTENDO OMV SEJAM PROCESSADAS NUM TEMPO MUITO MENOR. DESSE MODO, A INVENÇÃO PROPORCIONA UM PROCESSO PARA PREPARAR OMVS BACTERIANAS, QUE COMPREENDE UMA ETAPA DE ULTRAFILTRAÇÃO. A ETAPA DE ULTRAFILTRAÇÃO É REALIZADA NUMA SUSPENSÃO AQUOSA DE OMVS DEPOIS DE AS MESMAS SEREM PREPARADAS A PARTIR DE BACTÉRIAS E AS OMVS PERMANECEM EM SUSPENSÃO DEPOIS DA ETAPA DE FILTRAÇÃO. A INVENÇÃO É PARTICULARMENTE ÚTIL PARA PREPARAR OMVS A PARTIR DE NEISSERIA MENINGITIDIS.

RESUMO**"ULTRAFILTRAÇÃO E ULTRACENTRIFUGAÇÃO PARA A PREPARAÇÃO DE
VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA"**

Em vez de uma etapa de centrifugação durante a preparação de vesículas de membrana externa (OMVs) a partir de bactérias, a invenção utiliza ultrafiltração. Isto permite que quantidades muito maiores de sobrenadante contendo OMV sejam processadas num tempo muito menor. Desse modo, a invenção proporciona um processo para preparar OMVs bacterianas, que compreende uma etapa de ultrafiltração. A etapa de ultrafiltração é realizada numa suspensão aquosa de OMVs depois de as mesmas serem preparadas a partir de bactérias e as OMVs permanecem em suspensão depois da etapa de filtração. A invenção é particularmente útil para preparar OMVs a partir de *Neisseria meningitidis*.

DESCRIÇÃO

"ULTRAFILTRAÇÃO E ULTRACENTRIFUGAÇÃO PARA A PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA"

CAMPO DE APLICAÇÃO

A presente invenção está no campo da preparação de vesículas para fins de imunização.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

Uma das várias abordagens para imunização contra a infecção por *N. meningitidis* é utilizar vesículas de membrana externa (OMVs, do inglês *Outer Membrane Vesicles*). Uma vacina eficaz de OMV contra o serogrupo B foi produzida pelo Instituto Nacional Norueguês de Saúde Pública [por exemplo, ref. 1] mas, embora esta vacina seja segura e evite a doença NmB, a sua eficácia é limitada à estirpe utilizada para fazer a vacina.

A vacina "RIVM" é baseada em vesículas que contêm seis subtipos de PorA diferentes e demonstrou ser imunogénica em crianças em ensaios clínicos de fase II [2].

As referências 3 & 4 revelam uma vacina contra serotipos patogénicos meningocócicos diferentes do serogrupo com base em OMVs que retêm um complexo de proteína de 65-kDa. A referência 5 revela uma vacina que compreende OMVs de

estirpes meningocócicas geneticamente modificadas, com as OMVs compreendendo: pelo menos uma proteína de membrana externa (OMP) de Classe 1 mas não compreendendo uma OMP de Classe 2/3. A referência 6 revela OMVs que têm mutações nas suas ansas da superfície. A referência 7 revela composições que compreendem OMVs suplementadas com proteínas de ligação a transferrina (por exemplo, TbpA e TbpB) e/ou Cu/Zn superóxido dismutase. A referência 8 revela composições que compreendem OMVs suplementadas por várias proteínas. As referências 9 & 10 também descrevem preparações de OMV a partir de meningococos.

A referência 11 revela um processo para preparar vacinas à base de OMV, particularmente para o meningococo do serogrupo A que compreende as seguintes 10 etapas: (a) cultivar as células bacterianas; (b) concentrar as células cultivadas da etapa (a); (c) tratar as células com um detergente de sal ácido biliar a um pH suficientemente alto para não precipitar o detergente, para inativar as bactérias, romper a membrana externa das bactérias e formar vesículas da membrana externa das bactérias, as referidas vesículas compreendendo componentes de membrana externa principalmente apresentados na sua forma nativa; (d) centrifugar a composição da etapa (c) a 10.000–20.000 x g por cerca de 1 a 2 horas para separar as vesículas da membrana externa das células tratadas e detritos de células, e colher o sobrenadante; (e) realizar uma centrifugação a alta velocidade do sobrenadante da etapa (d) e colher as vesículas de membrana externa num grânulo; (f) redispersar o grânulo da etapa (e) num tampão por agitação à temperatura ambiente; (g)

realizar uma segunda centrifugação a alta velocidade de acordo com a etapa (e), colher as vesículas de membrana externa num grânulo; (h) redispersar o grânulo da etapa (g) num meio aquoso contendo um agente de estabilização por meio de agitação à temperatura ambiente; (i) realizar uma filtração estéril escalonada através de pelo menos dois filtros de tamanho de poro decrescente da composição redispersa da etapa (h), terminar com um filtro de tamanho de poro de cerca de 0,2 μm ; e (j) opcionalmente incluir a composição da etapa (i) num veículo e/ou composição adjuvante farmacologicamente aceitável.

O documento US 2003/0059444-A revela um método para substituir uma sequência de etapas de ultracentrifugação por cromatografia de troca iônica e ultrafiltração.

É um objectivo da presente invenção proporcionar um processo melhorado para preparar OMVs para utilização em vacinas, em particular um processo que pode proporcionar uma quantidade maior de OMVs em menos tempo, e particularmente um processo adequado para utilização em escala industrial.

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

A invenção é baseada na constatação que, em comparação com a centrifugação utilizada na etapa (e) do processo de referência 11, a ultrafiltração permite que quantidades muito maiores de sobrenadante contendo OMV sejam processadas num tempo muito menor (tipicamente >15 litros em 4 horas, em comparação com <1,5 litros em 10 horas). Assim como permite

que a etapa (e) seja realizada mais rapidamente, a utilização de ultrafiltração permite que a etapa (f) seja evitada porque as OMVs permanecem em suspensão.

Desse modo, a invenção proporciona um processo para preparar OMVs bacterianas de acordo com a reivindicação 1, que compreende uma etapa de ultrafiltração. A etapa de ultrafiltração é realizada numa suspensão aquosa de OMVs em bruto depois das mesmas terem sido preparadas a partir de bactérias e as OMVs permanecem em suspensão depois da etapa de ultrafiltração.

A etapa de ultrafiltração

A ultrafiltração é um processo de separação através do qual o solvente é removido de uma solução (incluindo uma solução coloidal) ou de uma suspensão forçando o mesmo a fluir através de uma membrana por meio da aplicação de uma pressão hidráulica. Os componentes na solução que são significativamente maiores do que o solvente não podem passar através da membrana. Desse modo, a ultrafiltração separa os componentes com base no tamanho.

A etapa de ultrafiltração, preferencialmente, resulta na diafiltração da solução. Na diafiltração, o solvente e/ou microssolutos (por exemplos, sais) que são removidos durante a ultrafiltração são substituídos por novo solvente e microssolutos. Em geral, a remoção e a substituição ocorrem à mesma taxa e o volume da solução é desse modo mantido constante. O efeito global do processo é, desse modo, a

substituição de solvente/microssolutos originais por novos solvente/microssolutos. O processo da invenção pode assim incluir uma etapa de diafiltração.

A ultrafiltração é preferencialmente uma ultrafiltração de fluxo cruzado ou fluxo tangencial, em que a solução flui substancialmente paralela à superfície da membrana, em vez de fluir perpendicular à superfície como na filtração habitual.

As membranas preferidas para utilização na etapa de ultrafiltração têm um corte de cerca de 300 kDa.

A etapa de ultrafiltração, preferencialmente, dura menos de 10 horas, por exemplo, entre 2 e 6 horas, preferencialmente entre 3 e 5 horas, por exemplo, entre 3,5 e 4,5 horas.

As membranas podem ser feitas de qualquer material adequado, por exemplo, polietersulfona.

Etapas de pré-ultrafiltração

Antes da etapa de ultrafiltração, o processo da invenção, tipicamente, compreenderá uma etapa inicial de cultivo de células bacterianas (por exemplo, em caldo ou em meio de cultura sólido), opcionalmente seguido por uma etapa de recolher e/ou concentrar as células cultivadas (por exemplo, por filtração ou por uma centrifugação a baixa velocidade para granular as células). No entanto, a invenção pode ser realizada em bactérias que já foram cultivadas e/ou

colhidas separadamente. A cultura bacteriana, preferencialmente, não envolve a utilização de produtos sanguíneos nem material contaminado com um agente de encefalopatia espongiforme transmissível.

A etapa de ultrafiltração é realizada numa suspensão aquosa de OMVs em bruto depois de as mesmas terem sido preparadas a partir de bactérias. Antes da ultrafiltração, o processo pode, portanto, compreender uma etapa de preparação de OMV em que as células são tratadas para romper as suas membranas externas. A preparação de OMVs a partir de meningococos é bem conhecida na técnica. Os métodos para obter preparações adequadas são revelados, por exemplo, nas referências 1 a 25. As técnicas para formar OMVs incluem tratar as bactérias com um detergente de sal de ácido biliar (por exemplo, sais de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc., com desoxicolato de sódio [26 & 27] sendo preferido para tratar *Neisseria*) a um pH suficientemente alto para não precipitar o detergente [11]. Outras técnicas podem ser realizadas substancialmente na ausência de detergente [28] utilizando técnicas, tais como sonicação, homogeneização, microfluidização, cavitação, choque osmótico, moagem, prensa francesa, mistura, etc.

A fim de preservar a conformação nativa das proteínas e outros antigénios de membrana externa instáveis, condições suaves são em geral seleccionadas para a preparação das OMVs. A inactivação por calor de bactérias (por exemplo, a 56° C ou

superior) é assim preferencialmente evitada, bem como a desnaturação do solvente.

Etapas de pós-ultrafiltração

Depois da etapa de ultrafiltração, as OMVs são tratadas adicionalmente.

Por exemplo, as OMVs podem ser esterilizadas. A esterilização é preferencialmente uma etapa final antes da embalagem como um produto farmacêutico e pode ser convenientemente obtida por esterilização por filtro. Embora as OMVs passem através de filtros padrão de 0,22 μm , estes podem rapidamente ficar obstruídos por outro material e, desse modo, é preferido realizar etapas sequenciais de esterilização por filtro através de uma série de filtros de tamanho de poro decrescente, terminando com um filtro de esterilização padrão (por exemplo, um filtro de 0,22 μm). Exemplos de filtros precedentes seriam aqueles com tamanho de poro de 0,08 μm , 0,45 μm , etc. A esterilização vantajosamente ocorre à temperatura ambiente ou acima, em vez de a temperaturas de refrigeração. A flexibilidade da vesícula é maior à temperatura ambiente e vesículas maiores ($\sim 0,2$ μm) podem assim passar através de um filtro de 0,22 μm mais facilmente, causando menos obstrução de filtros.

As OMVs são centrifugadas (por exemplo, ultracentrifugadas) depois de a ultrafiltração ter ocorrido. Desse modo, a invenção não substitui completamente a utilização da ultracentrifugação durante a preparação de OMV,

mas remove pelo menos uma etapa de ultracentrifugação relativa à ref. 11. Uma etapa de ultracentrifugação normal requer cerca de 13 horas para 1,3 litros de suspensão de OMV, e portanto um grande volume de OMV exige um grande recurso de ultracentrifugação. A ultrafiltração de acordo com a invenção pode ser utilizada para reduzir o volume que tem de ser ultracentrifugado (em cerca de 3 vezes) e desse modo pode melhorar o rendimento embora a ultracentrifugação não seja totalmente evitada.

As OMVs podem ser combinadas com veículos e/ou adjuvantes e/ou estabilizantes farmacêuticos. Por exemplo, o(s) grânulo(s) da ultracentrifugação são ressuspensos (por exemplo numa solução de sacarose, preferencialmente cerca de 3% de sacarose) e podem então ser submetidos à esterilização por filtro conforme descrito acima.

As OMVs podem ser sonicadas. A sonicação é particularmente útil entre a ressuspensão de grânulos de centrifugação e a esterilização.

Depois da ressuspensão, as preparações de OMV, preferencialmente contêm entre 500 e 2000 mg de proteína por mililitro, por exemplo, entre 900 e 1800 mg/mL, ou 1000 ± 100 mg/mL.

Processo total para preparar OMVs esterilizadas

De um modo geral, portanto, o processo da invenção incluirá as seguintes etapas: (1) cultivar as células

bacterianas; (2) colher as células cultivadas; (3) formação de OMV; (4) separação de OMV dos detritos celulares para dar uma suspensão aquosa de OMV; (5) ultrafiltração; (6) centrifugação e ressuspensão para colher as OMV purificadas; e (7) esterilização. O pH pode ser ajustado em qualquer estágio necessário. De modo similar, pode ser utilizada diluição conforme apropriado.

A etapa (5) nesse processo substitui as etapas (e) e (f) da referência 11.

A bactéria

A bactéria da qual as OMVs são preparadas são Gram negativas. A bactéria pode ser de qualquer género adequado, incluindo *Moraxella* (por exemplo, *M. catarrhalis* [29,30]), *Shigella* (por exemplo, *S. flexneri* [31,32]), *Pseudomonas* (por exemplo, *P. aeruginosa* [31,32]), *Treponema* (por exemplo, *T. pallidum* [33]), *Haemophilus* (por exemplo, *H. influenzae* [9 & 10]), *Porphyromonas* (por exemplo, *P. gingivalis* [34]) ou *Helicobacter* (por exemplo, *H. pylori* [35]), mas é preferencialmente do género *Neisseria*. As espécies preferidas de *Neisseria* são *N. meningitidis*, *N. lactamica* [36] e *N. gonorrhoeae* [37 & 38]. Em *N. meningitidis*, qualquer um dos serogrupos A, C, W135 e Y pode ser utilizado, mas é preferido preparar vesículas a partir do serogrupo B.

As estirpes preferidas no serogrupo B são MC58, 2996, H4476, 394/98 e a estirpe da Nova Zelândia 98/254. Os melhores serotipos e estirpes a serem utilizados, no entanto

dependerão das estirpes prevalentes num local geográfico particular. Por exemplo, os meningococos podem ser de qualquer serotipo (por exemplo, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), de qualquer serosubtipo (P1.2; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.7,16; P1.7,16b; P1.9; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.15; P1.21,16; P1.22,14; etc.) e de qualquer imunotipo (por exemplo, L1; L3,3,7; L10; etc.), e as estirpes preferidas incluem: (a) B:4:P1.4; (b) B:4:P1.15; (c) B:15:P1.7,16; e (d) B:4:P1.7b,4. Os meningococos podem ser de qualquer linhagem adequada, incluindo linhagens hiperinvasivas e hipervirulentas, por exemplo, qualquer das sete seguintes linhagens hipervirulentas: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complexo ET-5; complexo ET-37; agrupamento A4; linhagem 3. Estas linhagens foram definidas por electroforese de enzima multilocus (MLEE), mas a tipificação da sequência multilocus (MLST) também foi utilizada para classificar meningococos [ref. 39] por exemplo, o complexo ET-37 é o complexo ST-11 por MLST, o complexo ET-5 é ST-32 (ET-5), a linhagem 3 é ST-41/44, etc.

Para reduzir a actividade pirogénica, é preferido que a bactéria tenha baixos níveis de endotoxina (LPS). São conhecidas bactérias mutantes adequadas, por exemplo *Neisseria* mutante [40] e *Helicobacter* mutante [41]. Processos para preparar membranas externas empobrecidas de LPS a partir de bactérias Gram negativas são revelados na referência 42.

A bactéria pode ser uma bactéria do tipo selvagem, ou pode ser uma bactéria recombinante. As bactérias recombinantes preferidas sobre-expressam (em relação à

estirpe do tipo selvagem correspondente) imunogénios tais como NspA, proteína 287 [8], proteína 741 [8], TbpA, TbpB, superóxido dismutase [7], etc. A bactéria pode expressar mais de uma proteína de membrana externa PorA classe I, por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou 6 dos subtipo PorA: P1.7,16; P1.5,2; P1.19,15; P1.5c,10; P1.12,13; e P1.7h,4 [por exemplo, refs. 12 & 14].

Outras bactérias recombinantes que podem ser utilizadas com a invenção têm uma ou mais mutações para diminuir (ou, preferencialmente, para silenciar) a expressão de produtos génicos particulares. Os genes preferidos para a regulação negativa e/ou para silenciar incluem: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, Gale, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, e/ou TbpB [9]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, Gale, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, PorA, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, e/ou TbpB [10]; (c) transglicosilase lítica NMB0033 [43]; (d) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, Gale, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, ThpA, e/ou TbpB [44]; e (e) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, OpA, OpC, PilC, PorA, PorB, SiaD, SynA, SynB, e/ou SynC [45].

Composições farmacêuticas

Para utilização humana, as OMVs em geral serão combinadas com um veículo farmacêuticamente aceitável.

O termo "veículo farmacêuticamente aceitável" refere-se

a um veículo para administração de um agente terapêutico, tais como anticorpos ou um polipéptido, genes, e outros agentes terapêuticos. O termo refere-se a qualquer veículo farmacêutico que não induz ele próprio a produção de anticorpos nocivos ao indivíduo que recebe a composição, e que pode ser administrado sem toxicidade indevida. Veículos adequados podem ser macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, e partículas de vírus inactivos. Tais veículos são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis nas composições terapêuticas podem incluir líquidos tais como água, soro fisiológico, glicerol e etanol. Podem também estar presentes em tais veículos substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, substâncias tamponantes do pH e outras. Tipicamente, as composições terapêuticas são preparadas como injectáveis, seja como soluções ou suspensões líquidas; formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção também podem ser preparadas. Os lipossomas estão incluídos na definição de um veículo farmacêuticamente aceitável. Os sais farmacêuticamente aceitáveis também podem estar presentes na composição farmacêutica, por exemplo, sais de ácidos minerais tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos e outros; e os sais de ácidos orgânicos tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, e outros. Uma completa discussão de excipientes farmacêuticamente aceitáveis está disponível na referência 46. A composição tipicamente incluirá soro fisiológico.

Uma vez formulada, as composições podem ser administradas directamente a um indivíduo. A administração, em geral, será realizada por injeção parentérica (por exemplo, por via subcutânea, intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular ou no espaço intersticial de um tecido) ou por administração por mucosa (por exemplo, por via oral, pulmonar, rectal, vaginal, intranasal [47, 48]), etc.). Podem também ser utilizadas aplicações transdérmicas, agulhas e biolística ou injectores. Injeção intramuscular é a maneira preferida de administração.

A dose e os meios de administração das composições farmacêuticas da invenção são determinados com base nas qualidades específicas da composição terapêutica, o estado, a idade e o peso do doente, o progresso da doença e outros factores relevantes.

As infecções por *Neisseria* afectam várias áreas do corpo e, desse modo, as composições da invenção podem ser preparadas de várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injectáveis, seja como soluções ou suspensões líquidas. As formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção também podem ser preparadas (por exemplo, uma composição liofilizada). A composição pode ser preparada para administração tópica, por exemplo, como uma pomada, creme ou pó. A composição pode ser preparada para administração oral, por exemplo, como um comprimido ou cápsula ou como um xarope (opcionalmente aromatizado). A composição pode ser preparada

para administração pulmonar, por exemplo, como um inalador, utilizando um pó fino ou um pulverizador. A composição pode ser preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, aural, ou ocular, por exemplo, como gotas.

As OMVs preparadas de acordo com o processo da invenção podem ser combinadas com um adjuvante. Os adjuvantes preferidos para aumentar a eficácia da composição incluem, mas não são limitados a: (A) MF59 (5% de Esqualeno, 0,5% de Tween 80, e 0,5% de Span 85, formulado em partículas submicrométricas utilizando um microfluidizador) [ver Capítulo 10 da Ref. 49; ver também ref. 50]; (B) micropartículas (isto é, uma partículas de ~100 nm a ~150 µm de diâmetro, mais preferencialmente, ~200 nm a ~30 µm de diâmetro, e mais preferencialmente, ~500 nm a ~10 µm de diâmetro) formadas de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (por exemplo, um poli(α -hidróxi ácido), um ácido poli-hidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, etc.), com o poli(láctico-co-glicólico) sendo preferido, opcionalmente tratado para ter uma superfície carregada negativamente (por exemplo com SDS) ou uma superfície carregada positivamente (por exemplo, com um detergente catiónico, tal como CTAB) [51 & 52]; lipossomas [ver Capítulos 13 e 14 da ref. 49]; (D) ISCOMs [ver Capítulo 23 da ref. 49], que podem ser desprovidos de detergente adicional [53]; (E) SAF, contendo 10% de Esqualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero de bloco plurónico L121 e thr-MDP, tanto microfluidizado numa emulsão submicrométrica como turbilhonado para gerar uma emulsão de tamanho de partícula

maior [ver Capítulo 12 da ref. 49]; (F) sistema adjuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) contendo 2% de Esqualeno, 0,2% de Tween 80, e um ou mais componentes de parede celular bacteriana do grupo que consiste em monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS, preferencialmente MPL + CWS (Detox™); (G) adjuvantes de saponinas, tais como QuilA ou QS21 [ver Capítulo 22 da ref. 49], também conhecido como Stimulon™; (H) quitosano [por exemplo, 54]; (I) adjuvante de Freund completo (CFA) e adjuvante de Freund incompleto (IFA); (J) citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferões (por exemplo, interferão- γ), factor estimulante de colónia de macrófagos, factor de necrose tumoral, etc. [ver Capítulos 27 & 28 da ref. 49]; (K) uma saponina (por exemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um esteroide) [55]; (L) monofosforil lípido A (MPL) ou MPL 3-O-deacilado (3dMPL) [por exemplo, capítulo 21 da ref. 49]; (M) combinações de 3dMPL por exemplo, com QS21 e/ou emulsões óleo em água [56]; (N) oligonucleótidos que compreendem motivos CpG [57] isto é, que contêm pelo menos um dinucleótido CG; (O) um éter de polioxietileno ou um éster de polioxietileno [58]; (P) um tensoactivo de éster de polioxietileno sorbitano em combinação com um octoxinol [59] ou tensoactivo de um éter ou éster alquil de polioxietileno em combinação com pelo menos um tensoactivo não iónico adicional tal como um octoxinol [60]; (Q) um oligonucleótido imunoestimulante (por exemplo, um oligonucleótido CpG) e uma saponina [61]; (R) um imunoestimulante e uma partícula de sal de metal [62]; (S) uma saponina e uma emulsão óleo-em-água [63]; (T) enterotoxina ("LT") *E. coli* inactivada pelo calor

ou seus mutantes destoxificados, tais como os mutantes K63 ou R72 [por exemplo, Capítulo 5 da ref. 64]; (U) toxina da cólera ("CT"), ou seus mutantes destoxificados [por exemplo, Capítulo 5 da ref. 64]; (V) ARN de fita dupla; (W) sais de alumínio, tais como hidróxidos de alumínio (incluindo oxihidróxidos), fosfatos de alumínio (incluindo hidroxifosfatos), sulfato de alumínio, etc. [Capítulos 8 & 9 da ref. 49]; (X) imitadores de monofosforil lípido A, tais como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida por exemplo, RC-529 [65]; (y) polifosfazeno (PCPP); (Z) um bioadesivo [66] tal como microesferas de ácido hialurónico esterificado [67] ou um mucoadesivo seleccionado do grupo que consiste em derivados reticulados de poli(ácido acrílico), álcool polivinílico, polivinil pirrolidona, polissacáridos e carboximetilcelulose. Outras substâncias que actuam como agentes imunoestimulantes também podem ser utilizadas [por exemplo, ver Capítulo 7 da ref. 49].

Os sais de alumínio são os adjuvantes preferidos para imunização parentérica. As toxinas mutantes são os adjuvantes mucosais preferidos. A utilização de um adjuvante de hidróxido de alumínio é mais preferida, particularmente para injeção intramuscular e este adjuvante é preferencialmente utilizado com um tampão histidina [68].

A invenção proporciona um processo para preparar uma composição farmacêutica, que compreende as etapas de: (i) preparar OMVs de acordo com a invenção; e (ii) formular as OMVs como um produto farmacêutico. A etapa (ii) pode envolver actividades tais como filtração, adição de adjuvantes, adição

de tampão, etc.

Composições à base de OMV e OMVs preparadas utilizando o método

As composições preparadas utilizando o método da invenção são preferencialmente composições imunogénicas e são mais preferencialmente composições de vacina. Tais composições podem ser utilizadas para produzir respostas imunes (por exemplo, respostas de anticorpos) num mamífero (por exemplo, num ser humano, tal como uma criança.

O pH da composição é preferencialmente entre 6 e 8, preferencialmente cerca de 7. O pH pode ser mantido por meio da utilização de um tampão. A composição pode ser estéril e/ou livre de pirogénio. A composição pode ser isotónica em relação a seres humanos. A composição pode ou não incluir um conservante (por exemplo, tiomersal, 2-fenoxietanol, etc.) São preferidas as composições livres de mercúrio.

Preferencialmente, a composição é livre de componentes derivados do sangue. A composição é preferencialmente livre de agentes de encefalopatia espongiiforme transmissível (por exemplo, priões). A composição é preferencialmente substancialmente livre de bactérias inteiras, e em particular de bactérias vivas.

A composição pode incluir material residual da preparação de vesículas (por exemplo, detergente, preferencialmente <0,4 µg de detergente por µg da proteína da

OMV). A composição pode incluir açúcares solúveis, por exemplo, dissacáridos tais como sacarose e trealose. O teor de LPS é preferencialmente $<0,2 \mu\text{g}$ por μg da proteína da OMV.

As composições podem ser distribuídas em vários recipientes, por exemplo frascos ou seringas pré-cheias. A utilização de frascos de vidro é preferida. Estes recipientes serão, em geral, esterilizados e hermeticamente fechados. Cada recipiente, preferencialmente, inclui uma dose única, por exemplo, 0,5 mL de líquido. Os recipientes podem ser embalados individualmente ou em múltiplos, por exemplo numa caixa de 10 frascos. Uma vez embaladas as composições da invenção são preferencialmente armazenadas a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, mas não devem ser congeladas.

As vacinas podem ser profiláticas (isto é, para evitar a doença) ou terapêutica (isto é, para reduzir ou eliminar os sintomas de uma doença).

As composições para administração a doentes compreenderão uma quantidade imunologicamente eficaz das OMVs. Uma "quantidade imunologicamente eficaz" é uma quantidade suficiente para provocar uma resposta imune num doente, e mais preferencialmente uma resposta imune protectora num doente. A quantidade precisa para um doente dependerá do seu tamanho e saúde, a natureza e grau do seu estado, e os produtos terapêuticos ou combinação de produtos terapêuticos seleccionados para administração. A quantidade eficaz para uma dada situação é determinada por experimentação de rotina e pertence ao julgamento de um médico. Para os fins

da presente invenção, uma quantidade imunologicamente eficaz será, em geral, administrada a uma dosagem de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, ou cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 50 mg/kg ou cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 10 mg/kg da composição da invenção no indivíduo ao qual é administrada. Uma composição típica incluirá 50 µm/mL de proteína.

Para além de antigénios de OMV, as composições podem incluir um ou mais dos seguintes antigénios adicionais:

- um antigénio sacárido do serogrupo A, C, W135 e/ou Y, de *N. meningitidis* tal como o oligossacárido revelado na ref. 142 do serogrupo C [ver também ref. 69] ou o oligossacárido da 146.
- antigénio de *Helicobacter pylori* tais como CagA [70 a 73], VacA [74, 75], NAP [76, 77, 78], HopX [por exemplo, 79], HopY [por exemplo, 79] e/ou urease.
- um antigénio sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por exemplo, 80, 81, 82].
- um antigénio do vírus da hepatite A, tal como o vírus inactivado [por exemplo, 83, 84].
- um antigénio do vírus da hepatite B, tais como os antigénios da superfície e/ou do núcleo [por exemplo, 84, 85].
- um antigénio do vírus da hepatite C [por exemplo, 86].
- um antigénio da difteria, tal como toxóide de difteria [por exemplo, capítulo 3 da ref. 87].
- antigénio do tétano, tal como toxóide do tétano [por exemplo, capítulo 4 da ref. 87].
- um antigénio da *Bordetella pertussis*, tal como

holotoxina pertússis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou aglutinogénios 2 e 3 [por exemplo, refs. 88 & 89]; antigénio de pertússis de célula inteira também pode ser utilizado.

- um antigénio sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por exemplo, 69].
- antigénio(s) da pólio [por exemplo, 90, 91] tal como OPV ou, preferencialmente, IPV.
- um antigénio de *N. gonorrhoeae* [por exemplo, 92, 93, 94, 95].
- um antigénio de *Chlamydia pneumoniae* [por exemplo, refs. 96 to 102].
- um antigénio de *Porphyromonas gingivalis* [por exemplo, 103].
- antigénio(s) da raiva [por exemplo, 104] tal como o vírus inactivado liofilizado [por exemplo, 105, RabAvert™].
- antigénio do sarampo, papeira e/ou rubéola [por exemplo, capítulos 9, 10 & 11 da ref. 87].
- antigénio(s) da influenza [por exemplo, capítulo 19 da ref. 87], tal como a hemaglutinina e/ou proteínas de superfície neuraminidase.
- antigénio(s) de um paramixovírus tal como vírus sincicial respiratório (RSV [106, 107]) e/ou vírus da parainfluenza (PIV3 [108]).
- um antigénio de *Moraxella catarrhalis* [por exemplo, 109].
- um antigénio de *Streptococcus pyogenes* (streptococcus grupo A) [por exemplo, 110, 111, 112].

- um antigénio de *Staphylococcus aureus* [por exemplo, 113].
- um antigénio do *Bacillus anthracis* [por exemplo, 114, 115, 116].
- um antigénio de um vírus da família flaviviridae (género flavivirus), tal como o vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, quatro serotipos de vírus de dengue, vírus da encefalite transmitida por carrapatos; vírus do oeste do Nilo.
- um antigénio de pestivírus, tal como do vírus da febre porcina clássica, vírus da diarreia viral bovina, e/ou vírus da doença da fronteira.
- um antigénio de parvovírus, por exemplo do parvovírus B19.
- uma proteína prião (por exemplo, a proteína prião CJD)
- uma proteína amilóide, tal como um beta péptido [117]
- um antigénio do cancro, tal como aqueles listados na Tabela 1 da ref. 118 ou nas tabelas 3 & 4 da ref. 119.

A inclusão de outros antigénios de *N. meningitidis* é preferida. Em particular, a composição pode incluir um antigénio de sacárido de um ou mais (isto é, 1, 2, 3 ou 4) dos serogrupos meningocócicos A, C, W135 e/ou Y. Quando menos de 4 desses serogrupos adicionais são incluídos, é preferido incluir pelo menos o serogrupo C por exemplo, C+A+W135, C+A+Y, C+W135+Y.

Quando um antigénio de sacárido ou hidrato de carbono é utilizado, é preferencialmente conjugado a uma proteína veículo a fim de aumentar a imunogenicidade [por exemplo,

refs. 120 a 129]. As proteínas veículo preferidas são toxinas ou toxóides bacterianos, tais como toxóides da difteria ou do tétano. O mutante da toxina da difteria CRM₁₉₇ é particularmente preferido. [130]. Outros polipéptidos veículos incluem a proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [131], péptidos sintéticos [132, 133], proteínas de choque térmico [134, 135], proteínas de pertússis [136, 137], proteína D de *H. influenzae* [138], citocinas [139], linfocinas [139], hormonas [139], factores de crescimento [139], toxina A ou B de *C. difficile* [140], proteínas de captação de ferro [141], etc. Sacáridos diferentes podem ser conjugados ao mesmo tipo ou a um tipo diferente de proteína veículo. Qualquer reacção de conjugação adequada pode ser utilizada, com qualquer ligante adequado, onde necessário. Para os conjugados meningocócicos [142-148], os veículos preferidos são toxóide da difteria, CRM197 e proteína D da *H. influenzae*.

Os antigénios de proteínas tóxicas podem ser destoxificados quando necessário, por exemplo, destoxificação da toxina pertússis por meios químicos e/ou genéticos [89].

Quando o antigénio da difteria é incluído na composição é preferido também incluir o antigénio do tétano e o antigénio de pertússis. De modo similar, quando um antigénio de tétano é incluído é preferido também incluir o antigénio da difteria e de pertússis. De modo similar, quando um antigénio de pertússis é incluído é preferido também incluir o antigénio de difteria e tétano. As combinações DTP são assim preferidas.

Os antigénios na composição tipicamente estarão presentes numa concentração de pelo menos 1 µg/mL cada. Em geral, a concentração de qualquer dado antigénio será suficiente para suscitar uma resposta imune contra aquele antigénio.

Como uma alternativa à utilização de antigénio de proteínas na composição da invenção, pode ser utilizado o ácido nucleico que codifica o antigénio [por exemplo, refs. 149 a 157]. Os componentes proteicos das composições da invenção podem assim ser substituídos pelo ácido nucleico (preferencialmente ADN, por exemplo, na forma de um plasmídeo) que codifica a proteína.

Métodos de tratamento

A invenção proporciona um método para produzir uma resposta imune num doente, compreendendo administrar uma dose imunogénica das OMVs da invenção no doente. A resposta imune é preferencialmente protectora e preferencialmente envolve anticorpos e/ou imunidade mediada por célula. O método pode produzir uma resposta de reforço.

O doente é preferencialmente um ser humano. Quando a vacina é para uso profilático, o ser humano é, preferencialmente uma criança (por exemplo, uma criança até 3 anos ou um bebé) ou um adolescente; quando a vacina é para uso terapêutico, o ser humano é preferencialmente um adolescente ou um adulto. Uma vacina destinada a crianças também pode ser administrada a adultos, por exemplo, para

avaliar segurança, dosagem, imunogenicidade, etc. O doente tem preferencialmente menos de 20 anos de idade, por exemplo, de 13 a 19 anos de idade, 8 a 12 anos de idade, 16 a 24 meses de idade, 6 a 8 meses de idade, 6 semanas a 5 meses de idade.

As vacinas da invenção são preferencialmente administradas por injeção intramuscular. Os locais típicos para a injeção incluem a parte superior da coxa ou a parte superior do braço.

A invenção também proporciona as OMVs da invenção para utilização em medicina.

A invenção também proporciona a utilização de OMVs da invenção na preparação de um medicamento para tratar e/ou prevenir a infecção meningocócica e/ou a meningite bacteriana.

A invenção pode ser utilizada para suscitar imunidade sistêmica e/ou mucosal.

O tratamento de dosagem pode ser um esquema de dose única ou um esquema de doses múltiplas. As doses múltiplas podem ser utilizadas num primeiro esquema de imunização primário e/ou num esquema de imunização de reforço, por exemplo, um esquema de imunização primário pode envolver três injeções, com um intervalo de cerca de 6 semanas entre cada injeção. Um volume típico para uma dose líquida intramuscular única é de 0,5 mL.

Definições

O termo "OMV" conforme utilizado nesse contexto inclui qualquer vesícula proteolipossômica obtida pela ruptura de uma membrana externa bacteriana para formar vesículas da membrana externa que incluem componentes proteicos da membrana externa. As OMVs são preparadas artificialmente a partir de bactérias (por exemplo por tratamento com detergente) e assim são distintas das microvesículas (MVs [158]) e 'OMVs nativas' ('NOMVs' [48]), ambas as quais são vesículas de membranas que ocorrem naturalmente que se formam espontaneamente durante o crescimento bacteriano e são libertadas no meio de cultura. As MVs podem ser obtidas pela cultura de *Neisseria* no caldo do meio de cultura, separando as células inteiras das bolhas mais pequenas no caldo do meio de cultura e depois colhendo as MVs do meio empobrecido de células. As estirpes para utilização na produção de MVs podem, em geral, ser seleccionadas com base na quantidade de MVs produzidas em cultura, por exemplo, as refs. 159 & 160 descrevem *Neisseria* com alta produção de MV.

O termo "compreendendo" pode significar "incluindo" bem como "consistindo", por exemplo, uma composição "consistindo" em X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

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

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

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 apresenta um processo que inclui duas etapas de ultracentrifugação sem ultrafiltração (não de acordo com a invenção). A Figura 2 ilustra um processo no qual uma etapa de centrifugação foi substituída por uma etapa de ultrafiltração.

MODOS PARA REALIZAR A INVENÇÃO

Exemplo 1 - OMVs do serogrupo B meningocócico (estirpe norueguesa)

O serogrupo B da *N. Meningitidis* (estirpe 44/76, da Noruega) foi cultivado em oito placas "de meio selectivo para Meningococos" a 35 °C em 5% de CO₂/ar atmosférico por 24 horas. As células foram colhidas em 2 tubos com 12 mL de meio de Frantz. O conteúdo dos tubos foi adicionado a frascos de 2 x 500 mL contendo meio de Frantz (150 mL) e desenvolvido com agitação por 12 horas para obter o desenvolvimento correcto para transferir para frascos de 2 x 5000 mL contendo meio de Frantz (1500 mL). Os frascos foram desenvolvidos com agitação por mais 12 horas para dar o inóculo. Um frasco foi adicionado a um fermentador Chemap com capacidade de 300 L, contendo 110

L do meio de Frantz pré-esterilizado e extracto de levedura dialisado esterilizado por filtração. Depois da inoculação o pH era de 7,1, mantido a 7,0 com NaOH 3 N. Foi realizada uma fermentação por aeração da superfície, controlando a quantidade de ar O₂ e o agitador aplicado, e cultivando por 10 horas a 35 °C. O desenvolvimento foi determinado a uma OD_{590nm}, de 7,10, o fermentador foi arrefecido para menos de 15 °C, o fornecimento de ar foi reduzido e a agitação foi continuada a 100 rpm de um dia para o outro.

A transferência da suspensão bacteriana do fermentador foi feita por pressão a uma unidade de filtração de fluxo cruzado Millipore CUF equipada com válvulas, bombas e um módulo de filtro com filtros de polietersulfona 4 Pellicon P2B300V05 (corte de 300 kD). A transferência inicial de 30 L de suspensão bacteriana foi seguida com uma concentração de volume constante até que o fermentador estivesse vazio, e depois uma outra concentração foi realizada para dar um volume de 5,5 L.

A concentração da suspensão foi realizada na unidade CFF fazendo circular a suspensão passar pelos filtros, com uma pressão de transmembrana sendo continuamente monitorizada e mantida a menos de 0,5 bar (observada: 0,5 bar no final da concentração).

O ajuste do pH da suspensão bacteriana concentrada do pH 7,0 para 8,2 foi feito adicionando, por meio de um sistema de tubagem, 5 L de tampão Tris-HCl 0,1 M de pH 9 com EDTA 10

mM, seguido por 15 minutos de agitação na unidade CFF para assegurar condições uniformes.

A inativação/extracção do material da membrana externa (OM) foi iniciado pela adição, por meio da tubagem, de 500 mL de um tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 9) contendo 10% de desoxicolato (DOC), para dar uma concentração final de 0,5%. Subsequentemente a suspensão foi circulada na unidade CFF por 30 minutos, e a suspensão extraída (9,5 L), verificada para estar completamente sem bactérias vivas, foi drenada por bombeamento para dentro de um frasco de 25 L.

Numa primeira experiência não de acordo com a invenção (experiência A; Figura 1), foram preparadas OMVs em bruto distribuindo a suspensão inactivada a tubos de centrifugação de 500 mL e centrifugando uma centrífuga Beckman a 9000 rpm (16650 x g) por 1 hora a 4 °C, colhendo 8,5 L de sobrenadante. 1,35 L de OMVs em bruto foram purificados por duas ultracentrifugação subsequentes a 19000 rpm, 4 °C por 13,6 horas e 6,8 horas respectivamente, colhendo o granulado. O granulado foi suspenso em 660 mL de sacarose a 3% com agitação magnética à temperatura ambiente até homogéneo, obtendo uma concentração do material purificado de 1,52 g/L de proteína total.

Numa segunda experiência (experiência B; Figura 2), foram preparados 3 L de OMVs em bruto a partir de suspensão bacteriana utilizando uma unidade de filtração de fluxo cruzado CUF equipada com válvulas, bombas e um módulo de filtro com filtros de polietersulfona 4 Pellicon P2B300V05

(corte de 300 kD). A transferência inicial de 1 L de OMVs em bruto foi seguida por uma concentração de volume constante até que os 3 L estavam acabados e depois diafiltrados por meio do adição de 5 L de tampão Tris-HCl 0,05 M de pH 8,6 com EDTA 2 mM, 1% de DOC e 20% de sacarose. O retentado obtido foi purificado por ultracentrifugação a 19000 rpm, 4 °C, por 6,8 horas, colhendo o granulado. O granulado foi suspenso em 1 L de sacarose a 3% com agitação magnética à temperatura ambiente até homogêneo, obtendo-se uma concentração de 0,85 g/L de proteína total no material purificado.

As purificações finais de OMV obtidas para a experiência A e B, depois de diluição com sacarose a 3% em torno de 1,2 g/L de proteína total, foram ambas realizadas a 20 °C pela filtração por 3 filtros de cápsula (Gelman Science Suporlife DCF) em sequência, primeiro pré-filtros de 0,8 µm e 0,45 µm, respectivamente, depois a filtração estéril final (0,22 µm), testando 836 mL de material purificado para a experiência A, com uma concentração de proteína inicial de 1,1 mg/mL e 1 L para a experiência B. As concentrações de proteína de OMV depois da filtração foram de 0,12 mg/mL e 0,59/mL respectivamente.

As OMVs foram caracterizadas como a seguir:

	Experiência B	Experiência A	Especificação
Desoxicolato (µg/g de proteína)	1,5	0,4	0,1-0,4
Proteína de ADN (µg/g de proteína)	0,004	0,004	<0,035

(continuação)

	Experiência B	Experiência A	Especificação
Endotoxina (UI/g de proteína)	$2,8 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$<20 \times 10^3$
LPS ($\mu\text{g/g}$ de proteína)	0,05	0,08	0,06-0,12
SDS page			
80 kDa	1,7	2,2	1-4
70 kDa	11,8	12,7	1-12
classe I	24,6	25,1	22-32
classe III	34,8	32,8	30-43
classe IV	12,0	12,2	9-18
classe V	15,0	15,1	10-24

Desse modo, as OMVs preparadas utilizando ultrafiltração têm uma composição similar àquelas obtidas por ultracentrifugação. Em comparação ao método da técnica anterior, no entanto, o método da invenção é muito mais simples e mais rápido.

Exemplo 2 - OMVs a partir de serogrupos B meningocócicos (estirpe Nova Zelândia)

O serogrupo B de *N. Meningitidis* (estirpe NZ 98/254, da Nova Zelândia) foi cultivado como anteriormente, excepto que: (a) foi utilizado meio de Catlin em vez de meio de Frantz; (b) as culturas iniciais de 150 mL foram desenvolvidas a um nível pronto para transferir para um fermentador Chemap com capacidade para 300 L, contendo 120 L de meio pré-esterilizado; (c) o desenvolvimento no fermentador Chemap por 12 horas; (d) o desenvolvimento foi determinado em OD_{590nm} de 5,90.

A transferência do fermentador foi como anteriormente, excepto que a concentração foi realizada até um volume de 5 L.

A concentração foi realizada como anteriormente.

O pH foi ajustado como anteriormente, excepto que: (a) o pH final foi 8,6; (b) a quantidade de tampão Tris-HCl 0,1 M adicionado foi de 6 L.

A inactivação/extracção foi como anteriormente, excepto: (a) foram adicionados 600 mL de tampão Tris-HCl; (b) o volume de suspensão extraído foi de 19,5 L.

A preparação das OMVs em bruto foi como anteriormente, excepto: (a) os tubos de centrifugação tinham um volume de 1000 mL; (b) a centrifugação foi de 8000 rpm (16650 x g) para dar 17,5 L de sobrenadante.

A filtração de fluxo cruzado para purificar as OMVs (em vez de centrifugação) foi como na experiência B acima, excepto: (a) utilização de 17,5 de OMVs em bruto; (b) utilização de dois filtros de polietersulfona P2B300V05 (corte de 300 kD); (c) utilização de uma transferência inicial de 4 L de OMVs em bruto; (d) diafiltração com 30 L de tampão Tris-HCl; (e) o grânulo foi ressuspenso em 1,2 L de sacarose a 3%; (f) o material homogéneo foi adicionalmente sonificado, e deu uma concentração final de material purificado de 1,5 g/L de proteína total.

A purificação final foi como anteriormente, excepto: (a) a filtração foi através de dois filtros de cápsulas (Sartoclean CA, Sartobran P) em sequência, primeiro pré-filtros de 0,8+0,62 µm, depois uma filtração estéril final de 0,45+0,22 µm. A concentração da proteína de OMV depois da filtração foi de 1,0 g/L.

As OMVs foram caracterizadas como a seguir:

	Exemplo 2	Especificação
Desoxicolato (µg/g de proteína)	0,4	0,1-0,4
ADN (µg/g de proteína)	0,0005	<0,035
Endotoxina (UI/g de proteína)	5393	<20 × 10 ³
LPS (µg/g de proteína)	0,10	0,06-0,12
SDS page		
80 kDa	3,8	1-4
70 kDa	6,4	1-12
classe I	18,7	22-32
classe III + FbpA	31,3	30-43
classe IV	10,7	9-18
classe V	2,7	10-24
NspA	3,9	1-7

Assim, o método de produção proporcionou OMVs com um mosaico de antigénio nativo e um nível fortemente reduzido de LPS. Em comparação com o método da técnica anterior onde foram utilizadas duas etapas de ultracentrifugação, no entanto, a invenção é muito mais simples e mais rápida.

Exemplo 3 - OMVs a partir de serogrupos B meningocócicos (estirpe Nova Zelândia)

As OMVs em bruto foram preparadas a partir da estirpe 98/254 conforme descrito acima. O pH foi ajustado para entre 7,5 e 9,0 (tipicamente entre 8,3 e 8,5) com tampão, e depois concentradas até 20 litros por ultrafiltração por entre 3,5 e 4,5 horas utilizando cassetes de Polissulfona Millipore Pellicon 2 com uma área de superfície de 3 m². O material concentrado foi diafiltrado contra 7 volumes de uma solução contendo Tris-EDTA, 1% de DOC e 20% de sacarose ('tampão B') e depois com 3 volumes de 'tampão B1' (o mesmo que o 'tampão B' mas com apenas 0,5% de DOC). O retentado foi de novo concentrado até 4 litros e colhido. O sistema de ultrafiltração foi lavado com o tampão B1. O retentado foi então lavado, e as OMVs (retentado + lavados) foram armazenados a 2-8 °C. A biocarga no material final foi zero e o teor de endotoxina foi de <0,05 UI/mL. O processo apresentou excelente consistência de lote para lote.

O material armazenado foi centrifugado numa ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XL 100K utilizando um rotor tipo 19 e frascos Beckman de 250 mL (220 ± 10 mL de material por frasco), 19000 rpm por 408 minutos a 2-8 °C. Os grânulos foram lavados em 10 mL de uma solução de sacarose a 3% e foram então ressuspensos em sacarose a 3% (volume de 60 mL adicionado) utilizando um agitador magnético a 700 rpm (2,5 cm bar) em frascos Beckman de 250 mL. O material ressuspenso foi sonicado por 300 minutos a <20 °C. Se necessário, o material sonicado foi diluído com uma solução de sacarose a 3% para dar uma concentração de proteína final de 1,2 mg/mL. A biocarga no material final foi zero e o processo apresentou excelente consistência de lote para lote.

As OMVs foram submetidas a uma etapa de filtração final, primeiro através de filtros de 0,8-0,65 µm e depois através de filtros de 0,22 µm. As OMVs sonicadas foram passadas para dentro de um recipiente de vidro esterilizado com pré-filtros de 0,2 m² Sartoclean CA de 0,8-0,65 µm. Esta pré-filtração foi realizada por 5-6 minutos com uma bomba peristáltica utilizando apenas um conjunto de filtros. O filtrado foi então passado para um segundo recipiente de vidro esterilizado com filtros de 0,4 m² Sartobran P 0,4-0,22 µm. Esta filtração durou 7-10 minutos, de novo com bombas peristálticas. Os pré-filtros foram lavados com 500-600 mL de sacarose a 3% e os filtros de 0,22 µm foram lavados com 200 mL de sacarose a 5% depois da filtração. O material de OMV final foi armazenado a 2-8 °C e continha <0,16 µg de LPS por µg de proteína e <0,4 µg de DOC por µg de proteína. A biocarga foi zero. O teor de proteína nas OMVs foi entre 800 µg/mL e 1000 µg/mL.

REFERÊNCIAS (cujos teores são aqui dados como incorporados por citação)

- [1] Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
- [2] de Kleijn et al. (2001) Vaccine 20:352-358.
- [3] US patent 5597572.
- [4] US patent 5747653.
- [5] Patente Europeia 0449958.
- [6] Pedido de Patente Europeia 0680512.
- [7] WO00/25811.
- [8] WO01/52885.

- [9] WO01/09350.
- [10] WO02/09746.
- [11] WO01/91788.
- [12] Claassen et al. (1996) *Vaccine* 14:1001-1008.
- [13] Cartwright et al. (1999) *Vaccine* 17:2612-2619.
- [14] Peeters et al. (1996) *Vaccine* 14:1009-1015.
- [15] Fu et al. (1995) *Biotechnology NY* 12:170-174.
- [16] Fredriksen et al. pages 818-824 of *Pathobiology and immunobiology of Neisseriaceae* (eds. Conde-Glez et al.) ISBN 968-6502-13-0.
- [17] Davies et al. (1990) *J. Immunol.Meth.* 134:215-225.
- [18] Saunders et al. (1999) *Infect. Immun.* 67:113-119.
- [19] Draabick et al. (2000) *Vaccine* 18:160-172.
- [20] Moreno et al. (1985) *Infect. Immun.* 47:527-533.
- [21] Milagres et al. (1994) *Infect. Immun.* 62:4419-4424.
- [22] Naess et al. (1998) *Infect. Immun.* 66:959-965.
- [23] Rosenqvist et al. (1998) *Dev.Biol.Stand.* 92:323-333.
- [24] Haneberg et al. (1998) *Infect. Immun.* 66:1334-1341.
- [25] Andersen et al. (1997) *Vaccine* 15:1225-1234.
- [26] Patente europea 0011243.
- [27] Fredriksen et al. (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
- [28] WO2004/019977.
- [29] Patentes US 5,552,146, 5,981,213 & 5,993,826; ver también WO93/03761.
- [30] Zhou et al. (1998) *FEMS Microbiol Lett* 163:223-228.
- [31] Kadurugamuwa & Beveridge (1999) *Microbiology* 145:2051-2060.
- [32] WO97/05899.
- [33] Blanco et al. (1999) *J Immunol* 163:2741-2746.
- [34] Kesavalu et al. (1992) *Infect. Immun.* 60:1455-1464.

- [35] Keenan et al. (1998) FEMS Microbiol Lett 161:21-27.
- [36] WO00/50074.
- [37] Parmar et al. (1997) Vaccine 15:1641-1651.
- [38] WO99/59625.
- [39] Maiden et al. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- [40] WO99/10497.
- [41] WO02/07763.
- [42] Patente Europea 0624376.
- [43] Adu-Bobie et al. (2004) Infect Immun 72:1914-1919.
- [44] WO 02/062378.
- [45] WO 2004/014417.
- [46] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th ed. ISBN: 0683306472.
- [47] Bakke et al. (2001) Infect. Immun. 69:5010-5015.
- [48] Katial et al. (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
- [49] Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [50] WO90/14837.
- [51] WO02/26212.
- [52] WO98/33487.
- [53] WO00/07621.
- [54] WO99/27960.
- [55] WO98/57659.
- [56] Pedidos de Patentes Europeas 0835318, 0735898 e 0761231.
- [57] Krieg (2000) Vaccine 19:618-622; Krieg (2001) Curr opin Mol Ther 2001 3:15-24; WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 and WO98/52581 etc.

- [58] WO99/52549.
- [59] WO01/21207.
- [60] WO01/21152.
- [61] WO00/62800.
- [62] WO00/23105.
- [63] WO99/11241.
- [64] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, number 1.
- [65] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [66] WO00/50078.
- [67] Singh et al. (2001) *J. Cont. Rele.* 70:267-276.
- [68] WO03/009869.
- [69] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [70] Covacci & Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
- [71] WO93/18150.
- [72] Covacci et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
- [73] Tummuru et al. (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
- [74] Marchetti et al. (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- [75] Telford et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
- [76] Evans et al. (1995) *Gene* 153:123-127.
- [77] WO96/01272 & WO96/01273, especially SEQ ID NO:6.
- [78] WO97/25429.
- [79] WO98/04702.
- [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [82] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [85] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.

- [86] Hsu et al. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915.
- [87] Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [88] Gustafsson et al. (1996) N. Eng/. J. Med. 334:349-355.
- [89] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH9:232-238.
- [90] Sutter et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
- [91] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
- [92] WO99/24578.
- [93] WO99/36544.
- [94] WO99/57280.
- [95] WO02/079243.
- [96] WO02/02606.
- [97] Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
- [98] Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
- [99] Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3):S524-S527.
- [100] WO99/27105.
- [101] WO00/27994.
- [102] WO00/37494.
- [103] Ross et al. (2001) Vaccine 19:4135-4142.
- [104] Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl:S2-6.
- [105] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
- [106] Anderson (2000) Vaccine 19 Suppl I:S59-65.
- [107] Kahn (2000) Curr Opin Pediatr 12:257-262.
- [108] Crowe (1995) Vaccine 13:415-421.
- [109] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107.
- [110] WO02/34771.
- [111] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii.
- [112] Ferretti et al. (2001) PNAS USA 98: 4658-4663.

- [113] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; ver também as páginas 1218-1219.
- [114] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
- [115] Demicheli et al. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
- [116] Stepanov et al. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
- [117] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24:305-307.
- [118] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384.
- [119] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305-1326.
- [120] Ramsay et al. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [121] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [122] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [123] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [124] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [125] Patente Europeia 0 477 508.
- [126] Patente US 5,306,492.
- [127] WO98/42721.
- [128] *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
- [129] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 or 012342335X.
- [130] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002)
- [131] EP-A-0372501
- [132] EP-A-0378881
- [133] EP-A-0427347
- [134] WO93/17712
- [135] WO94/03208
- [136] WO98/58668
- [137] EP-A-0471177

- [138] WO00/56360
- [139] WO91/01146
- [140] WO00/61761
- [141] WO01/72337
- [142] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-8.
- [143] Lieberman et al. (1996) *JAMA* 275:1499-503.
- [144] WO02/058737.
- [145] WO02/00249.
- [146] WO03/007985.
- [147] Rennels et al. (2002) *Pediatr Infect Dis J* 21:978-979.
- [148] Campbell et al. (2002) *J Infect Dis* 186:1848-1851.
- [149] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
- [150] Donnelly et al. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- [151] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- [152] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- [153] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- [154] Dubensky et al. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- [155] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
- [156] Donnelly et al. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- [157] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
- [158] WO02/0964.
- [159] Patente US 6,180,111.
- [160] WO01/34642.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- US 20030059444 A [0006]
- US 5597572 A [0089]
- US 5747653 A [0089]
- EP 0449958 A [0089]
- EP 0680512 A [0089]
- WO 0025811 A [0089]
- WO 0152885 A [0089]
- WO 0109350 A [0089]
- WO 0209746 A [0089]
- WO 0191788 A [0089]
- EP 0011243 A [0089]
- WO 2004019977 A [0089]
- US 5552146 A [0089]
- US 5981213 A [0089]
- US 5993826 A [0089]
- WO 9303761 A [0089]
- WO 9705899 A [0089]
- WO 0050074 A [0089]
- WO 9959625 A [0089]
- WO 9910497 A [0089]
- WO 0207763 A [0089]
- EP 0624376 A [0089]
- WO 02062378 A [0089]
- WO 2004014417 A [0089]
- WO 9014837 A [0089]
- WO 0226212 A [0089]
- WO 9833487 A [0089]
- WO 0007621 A [0089]
- WO 9927960 A [0089]

- WO 9857659 A [0089]
- EP 0835318 A [0089]
- EP 0735898 A [0089]
- EP 0761231 A [0089]
- WO 9602555 A [0089]
- WO 9816247 A [0089]
- WO 9818810 A [0089]
- WO 9840100 A [0089]
- WO 9855495 A [0089]
- WO 9837919 A [0089]
- WO 9852581 A [0089]
- WO 9952549 A [0089]
- WO 0121207 A [0089]
- WO 0121152 A [0089]
- WO 0062800 A [0089]
- WO 0023105 A [0089]
- WO 9911241 A [0089]
- WO 0050078 A [0089]
- WO 03009869 A [0089]
- WO 9318150 A [0089]
- WO 9601272 A [0089]
- WO 9601273 A [0089]
- WO 9725429 A [0089]
- WO 9804702 A [0089]
- WO 9924578 A [0089]
- WO 9936544 A [0089]
- WO 9957280 A [0089]
- WO 02079243 A [0089]
- WO 0202606 A [0089]
- WO 9927105 A [0089]
- WO 0027994 A [0089]
- WO 0 A [0089]
- WO 037494 A [0089]
- WO 0234771 A [0089]
- EP 0477508 A [0089]
- US 5306492 A [0089]
- WO 9842721 A [0089]
- EP 0372501 A [0089]
- EP 0378881 A [0089]
- EP 0427347 A [0089]
- WO 9317712 A [0089]
- WO 9403208 A [0089]
- WO 9858668 A [0089]
- EP 0471177 A [0089]
- WO 0056360 A [0089]

- WO 9101146 A [0089]
- WO 0061761 A [0089]
- WO 0172337 A [0089]
- WO 02058737 A [0089]
- WO 0200249 A [0089]
- WO 03007985 A [0089]
- WO 020964 A [0089]
- US 6180111 B [0089]
- WO 0134642 A [0089]

Literatura não relacionada com patente citada na descrição

- **Bjune et al.** Lancet, 1991, vol. 338 (8775), 1093-1096 [0089]
- **Claassen et al.** Vaccine, 1996, vol. 14, 1001-1008 [0089]
- **Cartwright et al.** Vaccine, 1999, vol. 17, 2612-2619 [0089]
- **Peeters et al.** Vaccine, 1996, vol. 14, 1009-1015 [0089]
- **Fu et al.** Biotechnology NY, 1995, vol. 12, 170-174 [0089]
- **Fredriksen et al.** Pathobiology and immunobiology of Neisseriaceae. 818-824 [0089]
- **Davies et al.** J. Immunol.Meth., 1990, vol. 134, 215-225 [0089]
- **Saunders et al.** Infect. Immun., 1999, vol. 67, 113-119 [0089]
- **Draabick et al.** Vaccine, 2000, vol. 18, 160-172 [0089]
- **Moreno et al.** Infect. Immun., 1985, vol. 47, 527-533 [0089]
- **Milagres et al.** Infect. Immun., 1994, vol. 62, 4419-4424 [0089]
- **Naess et al.** Infect. Immun., 1998, vol. 66, 959-965 [0089]
- **Rosenqvist et al.** Dev.Biol.Stand., 1998, vol. 92, 323-333 [0089]
- **Haneberg et al.** Infect. Immun., 1998, vol. 66, 1334-1341 [0089]
- **Andersen et al.** Vaccine, 1997, vol. 15, 1225-1234 [0089]
- **Fredriksen et al.** NIPH Ann., 1991, vol. 14 (2), 67-80 [0089]
- **Zhou et al.** FEMS Microbiol Lett, 1998, vol. 163, 223-228 [0089]
- **Kadurugamuwa; Beveridge.** Microbiology, 1999, vol. 145, 2051-2060 [0089]
- **Blanco et al.** J Immunol, 1999, vol. 163, 2741-2746 [0089]
- **Kesavalu et al.** Infect. Immun., 1992, vol. 60, 1455-1464

- [0089]
- **Keenan et al.** FEMS Microbiol Lett, 1998, vol. 161, 21-27 [0089]
 - **Parmar et al.** Vaccine, 1997, vol. 15, 1641-1651 [0089]
 - **Maiden et al.** PNAS USA, 1998, vol. 95, 3140-3145 [0089]
 - **Adu-Bobie et al.** Infect Immun, 2004, vol. 72, 1914-1919 [0089]
 - **Gennaro.** Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 2000 [0089]
 - **Bakke et al.** Infect. Immun., 2001, vol. 69, 5010-5015 [0089]
 - **Katial et al.** Infect. Immun., 2002, vol. 70, 702-707 [0089]
 - **Vaccine design: the subunit and adjuvant approach.** Plenum Press, 1995 [0089]
 - **Krieg.** Vaccine, 2000, vol. 19, 618-622 [0089]
 - **Krieg.** Curr opin Mol Ther, 2001, vol. 3, 15-24 [0089]
 - **Del Giudice et al.** Molecular Aspects of Medicine, 1998, vol. 19 (1 [0089]
 - **de Kleijn et al.** Vaccine, 2001, vol. 20, 352-358 [0089]
 - **Johnson et al.** Bioorg Med Chem Lett, 1999, vol. 9, 2273-2278 [0089]
 - **Singh et al.** J. Cont. Rele., 2001, vol. 70, 267-276 [0089]
 - **Costantino et al.** Vaccine, 1999, vol. 17, 1251-1263 [0089]
 - **Covacci; Rappuoli.** J. Exp. Med., 2000, vol. 19, 587-592 [0089]
 - **Covacci et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, vol. 90, 5791-5795 [0089]
 - **Tummuru et al.** Infect. Immun., 1994, vol. 61, 1799-1809 [0089]
 - **Marchetti et al.** Vaccine, 1998, vol. 16, 33-37 [0089]
 - **Telford et al.** J. Exp. Med., 1994, vol. 179, 1653-1658 [0089]
 - **Evans et al.** Gene, 1995, vol. 153, 123-127 [0089]
 - **Watson.** Pediatr Infect Dis J, 2000, vol. 19, 331-332 [0089]
 - **Rubin.** Pediatr Clin North Am, 2000, vol. 47, 269-285 [0089]
 - **Jedrzejewski.** Microbiol Mol Biol Rev, 2001, vol. 65, 187-207 [0089]
 - **Bell.** Pediatr Infect Dis J, 2000, vol. 19, 1187-1188 [0089]
 - **Iwarson.** APMIS, 1995, vol. 103, 321-326 [0089]
 - **Gerlich et al.** Vaccine, 1990, vol. 8, 63-6879-80 [0089]
 - **Hsu et al.** Clin Liver Dis, 1999, vol. 3, 901-915 [0089]
 - **Vaccines.** 1988 [0089]
 - **Gustafsson et al.** N. Eng/. J. Med., 1996, vol. 334, 349-355 [0089]
 - **Rappuoli et al.** TIBTECH, 1991, vol. 9, 232-238 [0089]

- **Sutter et al.** *Pediatr Clin North Am*, 2000, vol. 47, 287-308 [0089]
- **Zimmerman; Spann.** *Am Fam Physician*, 1999, vol. 59, 113-118125-126 [0089]
- **Kalman et al.** *Nature Genetics*, 1999, vol. 21, 385-389 [0089]
- **Read et al.** *Nucleic Acids Res*, 2000, vol. 28, 1397-406 [0089]
- **Shirai et al.** *J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 181 (3), S524-S527 [0089]
- **Ross et al.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 4135-4142 [0089]
- **Dreesen.** *Vaccine*, 1997, vol. 15, S2-6 [0089]
- **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 16 January 1998, vol. 47 (1), 12, 19 [0089]
- **Anderson.** *Vaccine*, 2000, vol. 19 (I), 59-65 [0089]
- **Kahn.** *Curr Opin Pediatr*, 2000, vol. 12, 257-262 [0089]
- **Crowe.** *Vaccine*, 1995, vol. 13, 415-421 [0089]
- **McMichael.** *Vaccine*, 2000, vol. 19 (1), 101-107 [0089]
- **Dale.** *Infect Dis Clin North Am*, 1999, vol. 13, 227-43 [0089]
- **Ferretti et al.** *PNAS USA*, vol. 98, 4658-4663 [0089]
- **Kuroda et al.** *Lancet*, 2001, vol. 357 (9264), 1225-1240 [0089]
- **LANCET**, 1218-1219 [0089]
- **J Toxicol Clin Toxicol**, 2001, vol. 39, 85-100 [0089]
- **Demicheli et al.** *Vaccine*, 1998, vol. 16, 880-884 [0089]
- **Stepanov et al.** *J Biotechnol*, 1996, vol. 44, 155-160 [0089]
- **Ingram.** *Trends Neurosci*, 2001, vol. 24, 305-307 [0089]
- **Rosenberg.** *Nature*, 2001, vol. 411, 380-384 [0089]
- **Moingeon.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 1305-1326 [0089]
- **Ramsay et al.** *Lancet*, 2001, vol. 357 (9251), 195-196 [0089]
- **Lindberg.** *Vaccine*, 1999, vol. 17 (2), 28-36 [0089]
- **Buttery ; Moxon.** *J R Coll Physicians Lond*, 2000, vol. 34, 163-168 [0089]
- **Ahmad; Chapnick.** *Infect Dis Clin North Am*, 1999, vol. 13, 113-133 [0089]
- **Goldblatt.** *J. Med. Microbiol.*, 1998, vol. 47, 563-567 [0089]
- **Conjugate Vaccines.** vol. 10, 48-114 [0089]
- **Hermanson.** *Bioconjugate Techniques*, 1996, ISBN 0123423368 [0089]
- **Research Disclosure**, January 2002, 453077 [0089]

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparar vesículas de membrana externa bacteriana (OMVs) para utilização em vacinas, que compreende as etapas de: (i) ultrafiltração realizada numa suspensão aquosa de OMVs em bruto que foram preparadas a partir de bactérias Gram negativas, em que as OMVs permanecem em suspensão depois da etapa de ultrafiltração; (ii) ultracentrifugação da suspensão; e (iii) ressuspensão das OMVs ultracentrifugadas a partir dos grânulos da ultracentrifugação.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa de ultrafiltração resulta em diafiltração.
3. Processo de acordo com qualquer reivindicação precedente, em que a ultrafiltração é de fluxo cruzado ou de fluxo tangencial.
4. Processo de acordo com qualquer reivindicação precedente, em que a membrana utilizada para ultrafiltração tem um corte de cerca de 300 kDa.
5. Processo de acordo com qualquer reivindicação precedente, em que as OMVs são ressuspensas na etapa (iii) numa solução de sacarose.
6. Processo de acordo com qualquer reivindicação precedente, em que as OMVs são esterilizadas depois da etapa (iii).

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, em que a esterilização é por esterilização por filtração.
8. Processo para preparar OMVs bacterianas para utilização em vacinas, que compreende as etapas de: (a) cultivar as células bacterianas; (b) recolher e/ou concentrar as células cultivadas; (c) romper as membranas externas das células cultivadas; e (d) preparar OMVs por meio do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7.
9. Processo de acordo com qualquer reivindicação precedente, que compreende ainda a etapa de combinar as OMVs com veículos e/ou adjuvantes e/ou estabilizantes farmacêuticos.
10. Processo de acordo com a reivindicação precedente, em que a bactéria é *Neisseria meningitidis*.
11. Processo de acordo com a reivindicação 10, em que a bactéria é uma *N. meningitidis* do serogrupo B.
12. Processo de acordo com a reivindicação 11, em que a bactéria é uma estirpe B:4:P1.4, uma estirpe B:4:P1.15, uma estirpe B:4:P1.7b,4 ou uma estirpe B:15:P1.7,16.
13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, em que a *N. meningitidis* tem uma ou mais mutações para diminuir ou silenciar a expressão de um produto génico.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que o produto génico é Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, ExbB, ExbD, FrpB, GaleE, HtrB, MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, NMB0033, OpA, OpC, PhoP, PiIC, PmrE, PmrF, PorA, PorB, rmpM, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, SynA, SynB, SynC, TbpA e/ou TbpB.

FIGURA 1

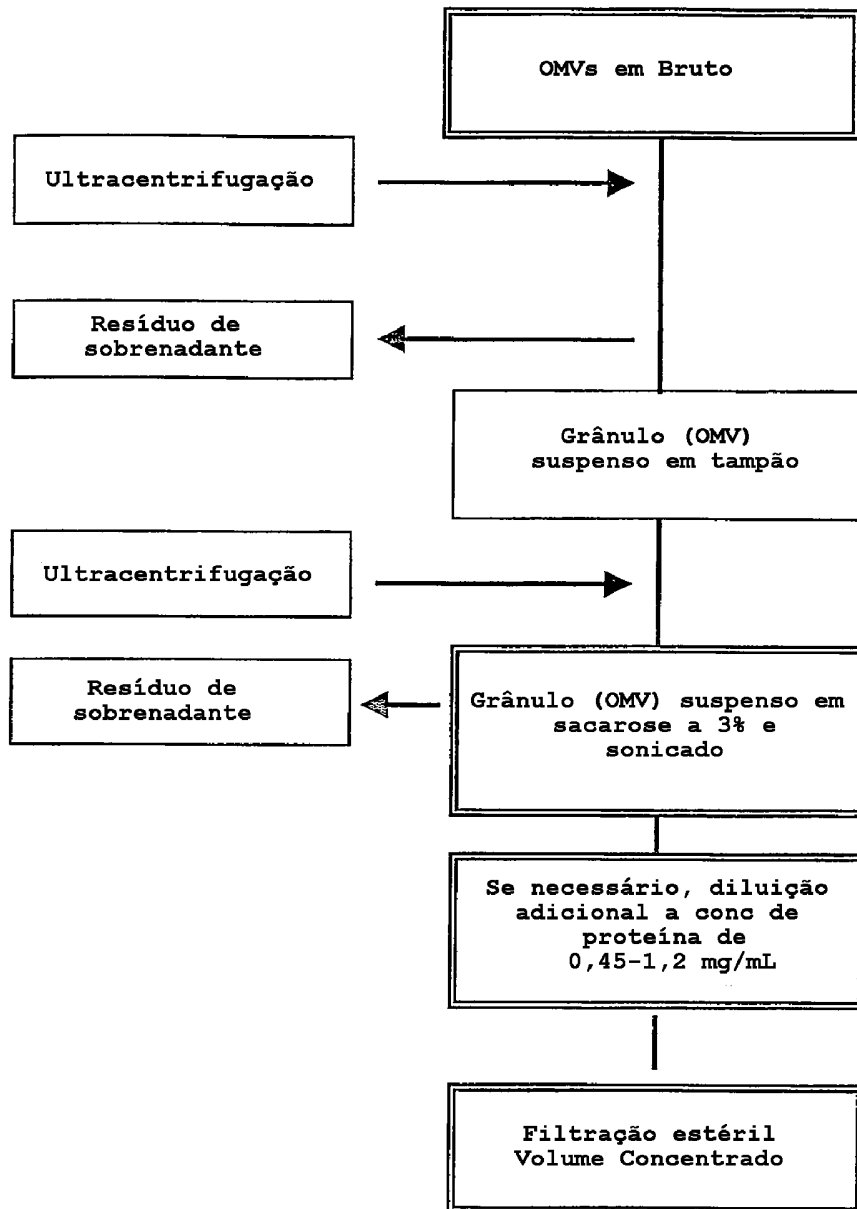


FIGURA 2

