



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

(21) **BR 122016015627-3 A2**

(22) **Data do Depósito:** 17/10/2008

(43) **Data da Publicação:** 23/04/2009



(54) **Título:** KIT, COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA LIOFILIZADA E MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA

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

(30) **Prioridade Unionista:** 19/10/2007 US 60/999,590

(73) **Titular(es):** NOVARTIS AG

(72) **Inventor(es):** MARIO CONTORNI; DEREK O'HAGAN; MANMOHAN SINGH; JINA KAZZAZ; MILDRED UGOZZOLI

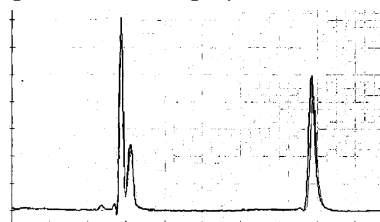
(85) **Data do Início da Fase Nacional:** 04/07/2016

(74) **Procurador(es):** ORLANDO DE SOUZA

(86) **Pedido Internacional:** PCT IB2008003283 de 17/10/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2009/050586 de 23/04/2009

(57) **Resumo:** É fornecida uma formulação dupla para vacinas contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis* (?Men-B?) que compreende: (i) um adjuvante de emulsão óleo-em-água e (ii) um componente imunogênico de Men-B em forma liofilizada. Os antígenos liofilizados de Men-B podem ser reconstituídos na forma líquida com adjuvante no momento de utilização, pronta para administração a um paciente. Verificou-se que essa formulação gera resultados excelentes em termos tanto de estabilidade quanto de imunogenicidade. O componente liofilizado também pode incluir um ou mais sacarídeos conjugados de N. meningitidis nos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y.



**KIT, COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA LIOFILIZADA E MÉTODO PARA  
PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA**

Dividido do PI 0818545-0, depositado em 17.10.2008.

**CAMPO TÉCNICO**

[001] Esta invenção está no campo da formulação de vacinas meningocócicas.

**FUNDAMENTOS DA TÉCNICA**

[002] Várias vacinas contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis* ("Men-B") estão atualmente sendo investigadas, mas elas compartilham uma característica comum.

[003] Todos os produtos da vesícula da membrana externa (OMV) produzidos por Novartis (MENZB™), pelo "Finlay Institute" (VA-MENGOC-BC™), pelo "Norwegian Institute of Public Health" (MENBVAC™) e pelo "Netherlands Vaccine Institute" (HEXAMEN™ e NONAMEN™) incluem um adjuvante de hidróxido de alumínio. A "vacina universal para o meningococo do sorogrupo B" relatada por Novartis na referência 1 também inclui um adjuvante de hidróxido de alumínio, bem como a vacina de OMV bivalente recentemente relatada na referência 2.

**REVELAÇÃO DA INVENÇÃO**

[004] No desenvolvimento da vacina de Men-B da Novartis, os inventores verificaram que a imunogenicidade ótima exige a presença de um adjuvante. Além disso, eles verificaram que a adsorção ao hidróxido de alumínio fornece boa estabilidade ao armazenamento para os antígenos da vacina. Para evitar a necessidade de utilização de sais de alumínio, no entanto, foram buscadas alternativas.

[005] O uso de adjuvantes não alumínio para

vacinas de Men-B já é conhecido. Por exemplo, a referência 3 relata o uso da emulsão óleo-em-água MF59 como um adjuvante para vesículas de Men-B, e a referência 4 descreve o uso de oligonucleotídeos imunoestimuladores e/ou MF59 como adjuvantes. Embora os resultados de imunogenicidade com MF59 fossem excelentes, e a continuação das pesquisas tenha demonstrado que esse adjuvante pode aumentar a cobertura de cepas de uma vacina de Men-B quando comparado com hidróxido de alumínio, trabalhos adicionais mostraram inesperadamente que imunógenos de Men-B tendo como adjuvante emulsões óleo-em-água têm uma estabilidade de longo prazo reduzida. Dessa forma, é um objetivo da invenção fornecer formas para o aumento da estabilidade ao armazenamento de vacinas de Men-B quando se utilizam adjuvantes de emulsão óleo-em-água.

[006] A experiência prévia com emulsões óleo-em-água vem da área de vacinas de influenza. O produto FLUAD<sup>TM</sup> inclui a emulsão MF59, e é distribuído em um formato líquido pré-misturado em um único recipiente (a abordagem "de um frasco"). Foi verificado que essa formulação pré-misturada é a formulação que fornece uma estabilidade reduzida para vacinas de Men-B.

[007] Como alternativa a uma formulação "de um frasco" com vacinas de emulsão óleo-em-água, uma abordagem de "de dois frascos" foi usada para influenza (por exemplo, veja a referência 5), para HSV (por exemplo, referência 6) e para HIV (por exemplo, referência 7), em que a vacina e a emulsão são distribuídas juntas, ambas em formato líquido, para mistura extemporânea no ponto de uso.

[008] De acordo com a presente invenção, é seguida

uma abordagem diferente para vacinas de Men-B, usando uma formulação dupla de (i) um adjuvante de emulsão óleo-em-água e (ii) um componente imunogênico de Men-B em forma liofilizada. Os antígenos liofilizados de Men-B podem ser reconstituídos em forma líquida com adjuvante no momento de utilização pronta para administração a um paciente. Verificou-se que essa formulação gera resultados excelentes tanto em termos de estabilidade quanto de imunogenicidade.

[009] Os inventores verificaram ainda que o componente liofilizado pode reter a eficácia quando um ou mais sacarídeos conjugados de *N. meningitidis* nos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y (Men-A, -C, -W135 e -Y) são incluídos. A combinação de antígenos para imunização contra múltiplos sorogrupos meningocócicos, incluindo o sorogrupo B, com o uso de um único componente liofilizado, é particularmente vantajosa.

[0010] Dessa forma, a invenção fornece um kit que compreende: (i) um primeiro recipiente contendo um adjuvante que compreende uma emulsão óleo-em-água; e (ii) um segundo recipiente contendo uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra o sorogrupo B de *N. meningitidis*. A composição antigênica liofilizada pode ainda compreender um sacarídeo capsular conjugado de um ou mais dos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y de *N. meningitidis*.

[0011] A invenção também fornece um método para preparação de uma composição imunogênica, que compreende uma etapa de mistura de: (i) um adjuvante que compreende uma emulsão óleo-em-água; e (ii) uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma

resposta imunológica contra o sorogrupo B de *N. meningitidis*. A composição antigênica liofilizada pode ainda compreender um sacarídeo capsular conjugado de um ou mais dos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y de *N. meningitidis*.

[0012] A invenção também fornece uma composição antigênica liofilizada que compreende (i) um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra o sorogrupo B de *N. meningitidis*, e (ii) um sacarídeo capsular conjugado de um ou mais dos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y de *N. meningitidis*. Essa composição liofilizada é adequada à reconstituição por um adjuvante que compreende uma emulsão óleo-em-água, e é adequada para uso como um componente do kit da invenção.

#### **A composição antigênica liofilizada**

[0013] A invenção utiliza uma composição antigênica liofilizada que inclui um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra Men-B. Ela pode opcionalmente incluir um sacarídeo capsular conjugado de um ou mais dos Men-A, Men-C, Men-W135 e/ou Men-Y.

[0014] O imunógeno de Men-B pode compreender vesículas da membrana de uma bactéria Men-B e/ou proteínas recombinantes de Men-B e/ou lipo-oligossacarídeo de Men-B (LOS).

[0015] A liofilização de OMVs de Men-B é conhecida na técnica [8], mas essas OMVs foram administradas subsequentemente junto com um adjuvante de fosfato de alumínio. Dessa forma, O problema de estabilidade do antígeno quando combinado com um adjuvante de emulsão óleo-em-água não foi relatado. Similarmente, a liofilização de antígenos de conjugado meningocócico é conhecida, incluindo

a reconstituição subsequente com MF59 [9], mas não em combinação com nenhum antígeno de Men-B.

#### **Componentes de Men-B que compreendem vesículas**

[0016] As vesículas para uso como vacina de componentes de Men-B incluem qualquer vesícula proteolipossômica obtida por ruptura de uma membrana externa bacteriana para formar vesículas que incluem componentes protéicos da membrana externa. Dessa forma, o termo inclui OMVs (algumas vezes denominadas "bolhas"), microvesículas (MVs [10]) e "OMVs nativas" ("NOMVs" [11]).

[0017] MVs e NOMVs são vesículas da membrana de ocorrência natural que se formam espontaneamente durante o crescimento bacteriano e são liberadas no meio de cultura. As MVs podem ser obtidas por cultivo de *Neisseria* em meio de caldo de cultura, separação de células inteiras das MVs menores no meio de caldo de cultura (por exemplo, por filtração ou por centrifugação em baixa velocidade para peletizar apenas as células, e não as vesículas menores), e depois coleta das MVs do meio sem células (por exemplo, por filtração, por precipitação diferencial ou agregação de MVs, por centrifugação em alta velocidade para peletizar as MVs). As cepas para uso na produção de MVs podem geralmente ser selecionadas com base na quantidade de MVs produzida na cultura, por exemplo, as referências 12 e 13 descrevem *Neisseria* com produção elevada de MV.

[0018] As OMVs são preparadas artificialmente por bactérias, e podem ser preparadas com o uso de tratamento com detergente (por exemplo, com desoxicolato), ou por meios sem detergente (por exemplo, veja a referência 14). Os métodos para a obtenção de preparações de OMV adequadas

são revelados, por exemplo, nas referências aqui citadas. As técnicas para a formação de OMVs incluem o tratamento de bactérias com um detergente de sal ácido biliar (por exemplo, sais de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico etc., com desoxicolato de sódio [15 e 16] sendo preferidos para o tratamento de *Neisseria*) em um pH suficientemente elevado para não precipitar o detergente [17]. Outras técnicas podem ser realizadas substancialmente na ausência de detergente [14] com o uso de técnicas como, por exemplo, sonificação, homogeneização, microfluidificação, cavitação, choque osmótico, trituração, prensa francesa, mistura etc. Os métodos que não utilizam detergente ou que utilizam pouco detergente podem reter antígenos úteis como, por exemplo, NspA [14]. Dessa forma, um método pode utilizar tampão de extração de OMV com cerca de 0,5% de desoxicolato ou menos, por exemplo, cerca de 0,2%, cerca de 0,1%, <0,05% ou zero.

[0019] Um processo útil para a preparação de OMV é descrito na referência 18, e envolve a ultrafiltração em OMVs brutas, ao invés de centrifugação em alta velocidade. O processo pode envolver uma etapa de ultracentrifugação após a realização da ultrafiltração.

[0020] As vesículas podem ser preparadas a partir de qualquer cepa de Men-B para uso com a invenção. Elas podem ser de qualquer sorotipo (por exemplo, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16 etc.), de qualquer sorosubtipo e de qualquer imunotipo (por exemplo, L1; L2; L3; L3,3,7; L10 etc.). Os meningococos podem ser de qualquer linhagem adequada, incluindo linhagens hiperinvasivas e hipervirulentas, por

exemplo, qualquer uma das sete linhagens hipervirulentas seguintes: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complexo ET-5; complexo ET-37; *cluster* A4; linhagem 3. Essas linhagens foram definidas por eletroforese *multilocus* de enzimas (MLEE), mas a tipagem *multilocus* de sequências (MLST) também foi usada para classificar meningococos [referência 19], por exemplo, o complexo ET-37 é o complexo ST-11 por MLST, o complexo ET-5 é o ST-32 (ET-5), a linhagem 3 é ST-41/44 etc. As vesículas podem ser preparadas a partir de cepas que possuem um dos seguintes subtipos: P1.2; P1.2,5; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.5,c; P1.5c,10; P1.7,16; P1.7,16b; P1.7h,4; P1.9; P1.15; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.21,16; P1.22,14.

[0021] As vesículas usadas com a invenção podem ser preparadas a partir de cepas de Men-B do tipo selvagem ou de cepas mutantes. Por exemplo, a referência 20 revela preparações de vesículas obtidas de *N. meningitidis* com um gene *fur* modificado. A referência 27 ensina que a expressão de *nspA* deve ser supra-regulada com *knockout* para *porA* e *cps* concomitantes. Mutantes *knockout* adicionais de *N. meningitidis* para a produção de OMV são revelados nas referências 27 a 29. A referência 21 revela vesículas nas quais fHBP está supra-regulado. A referência 22 revela a construção de vesículas de cepas modificadas para expressar seis subtipos de PorA diferentes. *Neisseria* mutante com níveis baixos de endotoxina, obtida por *knockout* de enzimas envolvidas na biossíntese de LPS, também pode ser usada [23, 24]. Todos esses ou outros mutantes podem ser usados com a invenção.

[0022] Dessa forma, uma cepa de Men-B usada com a



invenção pode, em algumas modalidades, expressar mais de um subtipo de PorA. Foram construídas previamente cepas de PorA 6-valentes e 9-valentes. A cepa pode expressar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 dos subtipos de PorA: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1 e/ou P1.18-1,3,6. Em outras modalidades, uma cepa pode ter sido infra-regulada para expressão de PorA, por exemplo, em que a quantidade de PorA foi reduzida em pelo menos 20% (por exemplo,  $\geq 30\%$ ,  $\geq 40\%$ ,  $\geq 50\%$ ,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 90\%$ ,  $\geq 95\%$  etc.), ou até mesmo *knockedout*, em relação aos níveis do tipo selvagem (por exemplo, em relação à cepa H44/76, como revelado na referência 30).

[0023] Em algumas modalidades, uma cepa de Men-B pode superexpressar (em relação à cepa do tipo selvagem correspondente) certas proteínas. Por exemplo, as cepas podem superexpressar NspA, proteína 287 [45], fHBP [21], TbpA e/ou TbpB [25], Cu, Zn-superóxido dismutase [25] etc.

[0024] Em algumas modalidades, uma cepa de Men-B pode incluir uma ou mais das mutações *knockout* e/ou de superexpressão reveladas nas referências 26 a 29. Genes preferidos para infra-regulação e/ou *knockout* incluem: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, Gale, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA e/ou TbpB [26]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, Gale, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA e/ou TbpB [27]; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, Gale, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA e/ou TbpB [28]; e (d) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaD, SynA, SynB e/ou SynC [29].

[0025] Quando é usada uma cepa mutante, em algumas modalidades, ela pode ter uma ou mais, ou todas, as seguintes características: (i) LgtB e/ou GalE infra-regulado ou *knocked-out* para truncar o LOS meningocócico; (ii) TbpA supra-regulado; (iii) Hsf supra-regulado; (iv) Omp85 supra-regulado; (v) LbpA supra-regulado; (vi) NspA supra-regulado; (vii) PorA *knocked-out*; (viii) FrpB infra-regulado ou *knocked-out*; (ix) Opa infra-regulado ou *knocked-out*; (x) Opc infra-regulado ou *knocked-out*; (xii) complexo do gene *cps* eliminado. Um LOS truncado pode ser aquele que não inclui um epitopo de sialil-lacto-N-neotetraose, por exemplo, ele pode ser um LOS deficiente em galactose. O LOS pode não ter cadeia  $\alpha$ .

[0026] Caso o LOS esteja presente em uma vesícula, será possível tratar a vesícula de modo a ligar seu LOS e os componentes protéicos (conjugação "intra-bolha" [29]).

[0027] A invenção pode ser usada com misturas de vesículas de diferentes cepas. Por exemplo, a referência 30 revela uma vacina que compreende composições multivalentes de vesícula meningocócica que compreendem uma primeira vesícula derivada de uma cepa meningocócica com um sorosubtipo prevalente em um país de utilização, e uma segunda vesícula derivada de uma cepa que não precisa ter um sorosubtipo prevalente em um país de utilização. A referência 31 também revela combinações úteis de diferentes vesículas. Uma combinação de vesículas de cepas em cada um dos imunotipos L2 e L3 pode ser usada em algumas modalidades.

[0028] Antígenos à base de vesículas podem ser preparados a partir de outros sorogrupos além de Men-B (por

exemplo, a referência 17 revela um processo para Men-A). Consequentemente, a invenção pode ser usada com vesículas preparadas a partir de outros sorogrupos além de Men-B (por exemplo, A, C, W135 e/ou Y). O foco principal, no entanto, é sobre Men-B.

**Componentes de Men-B que compreendem proteínas recombinantes**

[0029] Também foram relatadas proteínas recombinantes para uso como imunógenos de vacinas contra Men-B. Por exemplo, vários antígenos são relatados nas referências 32 a 40. Esses antígenos podem ser usados isoladamente ou em combinações. Quando múltiplas proteínas purificadas forem combinadas, será útil usar uma mistura de 10 ou menos (por exemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados.

[0030] Uma combinação de antígenos particularmente útil é revelada nas referências 1 e 40 e, portanto, uma composição da invenção pode incluir 1, 2, 3, 4 ou 5 de: (1) uma proteína "NadA"; (2) uma proteína "fHBP", conhecida anteriormente como "741"; (3) uma proteína "936"; (4) uma proteína "953"; e (5) uma proteína "287". Outras combinações de antígenos possíveis podem compreender uma proteína de ligação de transferrina (por exemplo, TbpA e/ou TbpB) e um antígeno Hsf. Outros possíveis antígenos purificados incluem proteínas que compreendem uma das seguintes sequências de aminoácidos: ID. DE SEQ. N°: 650 da referência 32; ID. DE SEQ. N°: 878 da referência 32; ID. DE SEQ. N°: 884 da referência 32; ID. DE SEQ. N°: 4 da referência 33; ID. DE SEQ. N°: 598 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 818 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 864 da

referência 34; ID. DE SEQ. N°: 866 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 1.196 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 1.272 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 1.274 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 1.640 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 1.788 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.288 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.466 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.554 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.576 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.606 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.608 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.616 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.668 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.780 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.932 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.958 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.970 da referência 34; ID. DE SEQ. N°: 2.988 da referência 34, ou um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos que: (a) possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais) para as referidas sequências; e/ou (b) compreende um fragmento de pelo menos  $n$  aminoácidos consecutivos das referidas sequências, em que  $n$  é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Fragmentos preferidos para (b) compreendem um epitopo da sequência relevante. Mais de um (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6) desses polipeptídeos podem ser incluídos.

[0031] O antígeno fHBP se enquadra em três variantes distintas [39]. Um componente de Men-B da invenção pode incluir uma única variante de fHBP, mas será útil incluir um fHBP de cada uma de duas ou todas as três variantes. Dessa forma, ele pode incluir uma combinação de dois ou três fHBPs purificados diferentes, selecionados de:

(a) uma primeira proteína, que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos  $a\%$  de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N°: 1, e/ou que compreende uma sequência de aminoácidos que consiste em um fragmento de pelo menos  $x$  aminoácidos contíguos do ID. DE SEQ. N°: 1;

(b) uma segunda proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos  $b\%$  de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N°: 2 e/ou que compreende uma sequência de aminoácidos que consiste em um fragmento de pelo menos  $y$  aminoácidos contíguos do ID. DE SEQ. N°: 2; e/ou

(c) uma terceira proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos  $c\%$  de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N°: 3 e/ou que compreende uma sequência de aminoácidos que consiste em um fragmento de pelo menos  $z$  aminoácidos contíguos do ID. DE SEQ. N°: 3.

[0032] O valor de  $a$  é de pelo menos 85, por exemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, ou mais.

[0033] O valor de  $b$  é de pelo menos 85, por exemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, ou mais.

[0034] O valor de  $c$  é de pelo menos 85, por exemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, ou mais.

[0035] Os valores de  $a$ ,  $b$  e  $c$  não estão intrinsecamente relacionados entre eles.

[0036] O valor de  $x$  é de pelo menos 7, por exemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250. O valor de  $y$  é

de pelo menos 7, por exemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250. O valor de  $z$  é de pelo menos 7, por exemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250. Os valores de  $x$ ,  $y$  e  $z$  não estão intrinsecamente relacionados entre eles.

[0037] Em algumas modalidades, a(s) proteína(s) fHBP serão lipidadas, por exemplo, em uma cisteína no terminal N. Em outras modalidades, elas não serão lipidadas.

[0038] Uma composição útil com base nas proteínas purificadas compreende uma mistura de: (i) um primeiro polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 4; (ii) um primeiro polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 5 ou ID. DE SEQ. N°: 7; e (iii) um primeiro polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 6. Veja as referências 1 e 40.

#### **Componentes de Men-B que compreendem LOS**

[0039] Foram relatadas vacinas meningocócicas à base de lipo-oligossacarídeo. O LOS pode ser usado isoladamente ou conjugado a um veículo. Quando conjugado, a conjugação pode ser por meio de uma porção de lipídeo A no LOS ou por qualquer porção adequada, por exemplo, seus resíduos KDO. Se a porção de lipídeo A do LOS está ausente, essa ligação alternativa é essencial.

[0040] O LOS pode ser de qualquer imunotipo, por exemplo, L2, L3, L7 etc.

[0041] Ao invés de utilizar LOS nativo, prefere-se utilizar uma forma modificada. Essas modificações podem ser obtidas quimicamente, mas é mais conveniente efetuar o *knockout* das enzimas em Men-B responsáveis por certas adições biossintéticas. Por exemplo, LOS pode ser modificado para remover pelo menos a Gal terminal da unidade de lacto-N-neotetraose nativa, e essa modificação pode ser obtida efetuando-se o *knockout* de uma ou mais das enzimas relevantes. As enzimas responsáveis pela adição dos dois monossacarídeos terminais em um LOS nativo (ácido siálico e galactose) podem ser *knocked out*, para eliminar apenas o Sia terminal ou para eliminar o Dissacarídeo Sia-Gal. O *knockout* do gene *IgtB*, por exemplo, remove Sia-Gal. Um *knockout* do gene *galE* também fornece um LOS modificado útil. Um gene de lipídeo A graxo transferase também pode ser *knocked out* [41].

[0042] Pelo menos um ácido graxo primário ligado ao O pode ser removido do LOS [42]. LOS que possui um número reduzido de cadeias acil secundárias por molécula de LOS também pode ser usado [43]. O LOS pode não ter cadeia  $\alpha$ .

[0043] O LOS pode compreender GlcNAc-Hep<sub>2</sub>fosfoetanolamina-KDO<sub>2</sub>-Lipídeo A [44].

#### **Componentes de Men-B mistos**

[0044] A invenção pode utilizar vesículas, polipeptídeos purificados ou LOS como o antígeno de Men-B. Ela também pode utilizar combinações desses três antígenos, por exemplo, (i) vesículas + polipeptídeos purificados; (ii) vesículas + LOS; (iii) polipeptídeos purificados + LOS; ou (iv) vesículas + polipeptídeos purificados + LOS. Essas combinações podem ser feitas por preparação dos

componentes individuais separadamente e depois misturando-os. Por exemplo, a referência 45 revela a adição de proteínas purificadas a vesículas para fornecer uma composição com eficácia mais ampla.

#### **Sorogrupos A, C, W135 e Y**

[0045] Vacinas conjugadas monovalentes contra o sorogrupo C foram aprovadas para uso humano, e incluem MENJUGATE™, MENINGITEC™ e NEISVAC-C™. Misturas de conjugados de sorogrupos A+C são conhecidas [46, 47] e misturas de conjugados de sorogrupos A+C+W135+Y foram relatadas [48-51] e aprovadas em 2005 como o produto aquoso MENACTRA™.

[0046] O componente liofilizado usado com a invenção pode incluir um ou mais conjugados de sacarídeos capsulares de 1, 2, 3 ou 4 dos sorogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, por exemplo, A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, A+W135+Y, A+C+W135+Y etc. Componentes que incluem sacarídeos de todos os quatro dos sorogrupos A, C, W135 e Y são preferidos.

[0047] O sacarídeo capsular do meningococo do sorogrupo A é um homopolímero de ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ )-ligado-N-acetil-D-manosamina-1-fosfato, com O-acetilação parcial nas posições C3 e C4. A acetilação na posição C-3 pode ser de 70-95%. As condições usadas para purificar o sacarídeo podem resultar na des-O-acetilação (por exemplo, sob condições básicas), mas é útil reter OAc nessa posição C-3. Em algumas modalidades, pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais) dos resíduos de manosamina nos sacarídeos do sorogrupo A são O-acetilados na posição C-3. Os grupos acetil podem ser substituídos com grupos de



bloqueio para evitar a hidrólise [52], e esses sacarídeos modificados ainda são sacarídeos do sorogrupo A dentro do significado da invenção.

[0048] O sacarídeo capsular do sorogrupo C é um homopolímero de ácido siálico ligado em ( $\alpha$  2 $\rightarrow$ 9) (ácido N-acetil neuramínico, ou "NeuNAC"). A estrutura do sacarídeo é escrita como  $\rightarrow$ 9)-Neu p NAc 7/8 OAc-( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ . A maioria das cepas do sorogrupo C possui grupos O-acetil em C-7 e/ou C-8 dos resíduos de ácido siálico, mas cerca de 15% dos isolados clínicos não possuem esse grupo O-acetil [53, 54]. A presença ou ausência de grupos OAc gera epitopos únicos, e a especificidade da ligação de anticorpo ao sacarídeo pode afetar sua atividade bactericida contra cepas O-acetiladas (OAc+) e des-O-acetiladas (OAc-) [55-57]. Os sacarídeos do sorogrupo C usados com a invenção podem ser preparados a partir de cepas OAc+ ou OAc-. As vacinas de conjugado de Men-C licenciadas incluem tanto sacarídeos OAc- (NEISVAC-C<sup>TM</sup>) quanto OAc+ (MENJUGATE<sup>TM</sup> e MENINGITEC<sup>TM</sup>). Em algumas modalidades, as cepas para a produção de conjugados do sorogrupo C são Cepas OAc+, por exemplo, do sorotipo 16, sorosubtipo P1.7a,1 etc.. Dessa forma, podem ser usadas Cepas OAc+ C:16:P1.7a,1. Cepas OAc+ no sorosubtipo P1.1 também são úteis, por exemplo, a cepa C11.

[0049] O sacarídeo do sorogrupo W135 é um polímero de unidades dissacarídicas de ácido siálico-galactose. Como o sacarídeo do sorogrupo C, ele possui uma O-acetilação variável, mas nas posições de ácido siálico 7 e 9 [58]. A estrutura é escrita como:  $\rightarrow$ 4)-D-Neup5Ac(7/9OAc)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-D-Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ .

[0050] O sacarídeo do sorogrupo Y é similar ao

sacarídeo do sorogrupo W135, exceto que a unidade dissacarídica de repetição inclui glicose ao invés de galactose. Como o sorogrupo W135, ele possui O-acetilação variável nas posições de ácido siálico 7 e 9 [58]. A estrutura do sorogrupo Y é escrita como:  $\rightarrow 4) -D\text{-Neup5Ac}(7/9\text{OAc}) -\alpha - (2\rightarrow 6) -D\text{-Glc} -\alpha - (1\rightarrow$ .

[0051] Os sacarídeos usados de acordo com a invenção podem ser O-acetilados como descrito acima (por exemplo, com o mesmo padrão de O-acetilação observado em sacarídeos capsulares nativos), ou podem ser parcialmente ou totalmente des-O-acetilados em uma ou mais posições dos anéis do sacarídeo, ou eles podem ser hiper-O-acetilados em relação aos sacarídeos capsulares nativos.

[0052] As porções de sacarídeo em conjugados podem compreender sacarídeos de comprimento total preparados a partir de meningococos, e/ou podem compreender fragmentos de sacarídeos de comprimento total, ou seja, os sacarídeos podem ser mais curtos do que os sacarídeos capsulares nativos observados em bactérias. Dessa forma, os sacarídeos podem ser despolimerizados, com a despolimerização ocorrendo durante ou após a purificação do sacarídeo, mas antes da conjugação. A despolimerização reduz o comprimento da cadeia dos sacarídeos. Um método de despolimerização envolve o uso de peróxido de hidrogênio [48]. O peróxido de hidrogênio é adicionado a um sacarídeo (por exemplo, para gerar uma concentração final de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 1%), e a mistura é então incubada (por exemplo, a cerca de  $55^\circ\text{C}$ ) até que tenha sido obtida uma redução desejada do comprimento da cadeia. Outro método de despolimerização envolve a hidrólise ácida [49]. Outros métodos de despolimerização são conhecidos na

técnica. Os sacarídeos usados para a preparação de conjugados para uso de acordo com a invenção podem ser obtidos por qualquer um desses métodos de despolimerização. A despolimerização pode ser usada a fim de fornecer um comprimento da cadeia ótimo para imunogenicidade e/ou para reduzir o comprimento da cadeia para maneabilidade física dos sacarídeos. Em algumas modalidades, os sacarídeos possuem a seguinte faixa de graus médios de polimerização (Dp): A = 10-20; C = 12-22; W135 = 15-25; Y = 15-25. Em termos de peso molecular, no lugar de Dp, faixas úteis para todos os sorogrupos: <100 kDa; 5 kDa-75 kDa; 7 kDa-50 kDa; 8 kDa-35 kDa; 12 kDa-25 kDa; 15 kDa-22 kDa.

[0053] Em algumas modalidades, o peso molecular médio para sacarídeos de cada um dos sorogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y pode ser de mais de 50 kDa, por exemplo,  $\geq 75$  kDa,  $\geq 100$  kDa,  $\geq 110$  kDa,  $\geq 120$  kDa,  $\geq 130$  kDa etc. [59], e até mesmo 1.500 kDa, em particular como determinado por MALLS. Por exemplo: um sacarídeo de Men-A pode estar na faixa de 50-500 kDa, por exemplo, 60-80 kDa; um sacarídeo de Men-C pode estar na faixa de 100-210 kDa; um sacarídeo de Men-W135 pode estar na faixa de 60-190 kDa, por exemplo, 120-140 kDa; e/ou um sacarídeo de Men-Y pode estar na faixa de 60-190 kDa, por exemplo, 150-160 kDa.

[0054] A massa de sacarídeo meningocócico por sorogrupo na vacina reconstituída normalmente será entre 1  $\mu\text{g}$  e 20  $\mu\text{g}$ , por exemplo, entre 2 e 10  $\mu\text{g}$  por sorogrupo, ou cerca de 4  $\mu\text{g}$  ou cerca de 5  $\mu\text{g}$  ou cerca de 10  $\mu\text{g}$ . Quando conjugados de mais de um sorogrupo são incluídos, eles poderão estar presentes em massas substancialmente iguais, por exemplo, a massa de cada sacarídeo do sorogrupo está

dentro de +10% entre eles. Como alternativa a uma proporção igual, pode ser usada uma massa dupla de sacarídeo do sorogrupo A. Dessa forma, uma vacina pode incluir sacarídeo de Men-A a 10 µg e Men-C, sacarídeos de W135 e Y a 5 µg cada.

[0055] Proteínas de transporte preferidas são toxinas bacterianas, por exemplo, toxinas da difteria ou do tétano, ou toxóides ou mutantes destes. Essas são comumente usadas em vacinas conjugadas. O mutante da toxina diftérica CRM<sub>197</sub> é particularmente preferido [60]. Outras proteínas de transporte adequadas incluem o complexo da proteína da membrana externa de *N. meningitidis* [61], peptídeos sintéticos [62, 63], proteínas do choque térmico [64, 65], proteínas de pertussis [66, 67], citocinas [68], linfocinas [68], hormônios [68], fatores de crescimento [68], proteínas artificiais que compreendem múltiplos epitopos de células T humanas CD4<sup>+</sup> de vários antígenos derivados de patógenos [69], por exemplo, N19 [70], proteína D de *H. influenzae* [71-73], pneumolisina [74] ou seus derivados atóxicos [75], proteína da superfície pneumocócica PspA [76], proteínas da captação de ferro [77], toxina A ou B de *C. difficile* [78], exoproteína recombinante A de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) [79] etc. Uma única proteína de transporte pode carregar sacarídeos de múltiplos sorogrupos diferentes [80], mas esse arranjo não é preferido. Quando o componente liofilizado incluir conjugados de mais de um sorogrupo meningocócico, os vários conjugados poderão utilizar diferentes proteínas de transporte (por exemplo, um sorogrupo em CRM<sup>197</sup>, no toxóide tetânico), ou eles podem usar a mesma proteína de

transporte (por exemplo, sacarídeos de dois sorogrupos conjugados separadamente à CRM<sup>197</sup> e depois combinados).

[0056] Conjugados com uma proporção de sacarídeo:proteína (p/p) entre 1:5 (ou seja, proteína em excesso) e 5:1 (ou seja, sacarídeo em excesso) podem ser usados, por exemplo, proporções entre 1:2 e 5:1 e proporções entre 1:1,25 e 1:2,5. Como descrito na referência 81, conjugados meningocócicos de diferentes sorogrupos em uma mistura podem ter diferentes proporções de sacarídeo:proteína, por exemplo, um pode ter uma proporção entre 1:2 e 1:5, enquanto outro possui uma proporção entre 5:1 e 1:1,99.

[0057] Sacarídeos e conjugados que possuem as características reveladas na referência 82 são úteis.

[0058] A molécula transportadora pode ser conjugada covalentemente ao sacarídeo meningocócico diretamente ou por meio de um vinculador. São conhecidos diversos vinculadores, por exemplo, um vinculador ácido adípico, que pode ser formado por acoplamento de um grupo -NH<sub>2</sub> livre (por exemplo, introduzido em um sacarídeo por aminação) com ácido adípico (usando, por exemplo, ativação de diimida), e depois acoplamento de uma proteína ao intermediário sacarídeo-ácido adípico resultante [83, 84]. Outro tipo preferido de ligação é um vinculador de carbonil, que pode ser formado por reação de um grupo hidroxil livre de um sacarídeo com CDI [85, 86], seguido por reação com uma proteína para formar uma ligação carbamato. Outros vinculadores incluem  $\beta$ -propionamido [87], nitrofenil-etilamina [88], haletos de haloacila [89], ligações glicosídicas [90], ácido 6-aminocapróico [91], N-

succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [92], diidrazida de ácido adípico ADH [93], porções C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [94], etc. A condensação de carbodiimida também pode ser usada [95].

[0059] Como descrito na referência 96, uma mistura pode incluir um conjugado com ligação direta sacarídeo/proteína e outro conjugado com ligação por meio de um vinculador. Esse arranjo se aplica particularmente quando se utilizam conjugados sacarídicos de diferentes sorogrupos meningocócicos, por exemplo, sacarídeos de Men-A e Men-C podem ser conjugados por meio de um vinculador, enquanto sacarídeos de Men-W135 e Men-Y podem ser conjugados diretamente a uma proteína de transporte.

[0060] Quando uma composição incluir um ou mais conjugados de Men-A, -C, -W e/ou -Y, em algumas modalidades, ele também poderá vantajosamente incluir um conjugado de Hib (veja abaixo). Quando uma composição incluir sacarídeos de mais de um sorogrupo meningocócico, haverá uma massa de sacarídeo média por sorogrupo. Caso sejam usadas massas substancialmente iguais de cada sorogrupo, a massa média será a mesma que cada massa individual; quando são usadas massas não iguais, a média irá diferir, por exemplo, com uma quantidade de 10:5:5:5 µg para uma mistura de Men-ACWY, a massa média será de 6,25 µg por sorogrupo. Caso um sacarídeo de Hib também seja incluído, em algumas modalidades, sua massa será substancialmente a mesma que a massa média de sacarídeo meningocócico por sorogrupo. Em algumas modalidades, a massa de sacarídeo de Hib será maior do que (por exemplo, pelo menos 1,5x) a massa média de sacarídeo meningocócico

por sorogrupo. Em algumas modalidades, a massa de sacarídeo de Hib será menor do que (por exemplo, pelo menos 1,5x) a massa média de sacarídeo meningocócico por sorogrupo [97].

#### **O adjuvante de emulsão óleo-em-água**

[0061] Vários adjuvantes de emulsão óleo-em-água são conhecidos, e eles tipicamente incluem pelo menos um óleo e pelo menos um tensoativo, com o óleo(s) e tensoativo(s) sendo biodegradáveis (metabolizáveis) e biocompatíveis. As gotículas de óleo na emulsão possuem geralmente menos de 51 µm de diâmetro, e podem até ter um diâmetro submícron, com esses pequenos tamanhos sendo obtidos com um microfluidificador para o fornecimento de emulsões estáveis. Gotículas com um tamanho de menos de 220 nm são preferidas, na medida em que elas podem ser submetidas à esterilização por filtro.

[0062] A invenção pode ser usada com óleos como, por exemplo, aqueles de uma fonte animal (por exemplo, de peixe) ou vegetal. Fontes para óleos vegetais incluem nozes, sementes e grãos. Óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de coco e azeite de oliva, os mais comumente disponíveis, exemplificam os óleos de nozes. Óleo de jojoba pode ser usado, por exemplo, obtido do favo de jojoba. Óleos de sementes incluem óleo de açafrão, óleo de semente de algodão, óleo de semente de girassol, óleo de semente de gergelim e semelhantes. No grupo dos grãos, o óleo de milho é o mais facilmente disponível, mas os óleos de outros grãos de cereais como, por exemplo, trigo, aveia, centeio, arroz, *teff*, *triticale* e semelhantes, 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 sementes, podem ser preparados por hidrólise, separação e esterificação dos materiais apropriados partindo dos óleos de nozes e de sementes. Gorduras e óleos de leite de mamíferos são metabolizáveis e, portanto, podem ser usados na prática desta invenção. Os procedimentos para a separação, purificação, saponificação e outros meios necessários para a obtenção de óleos puros a partir de fontes animais são bem conhecidos na técnica. A maioria dos peixes contém óleos metabolizáveis que podem ser facilmente recuperados. Por exemplo, o óleo de fígado de bacalhau, óleos de fígado de tubarão e o óleo de baleia, por exemplo, espermacete, exemplificam vários dos óleos que podem ser aqui usados. Diversos óleos de cadeia ramificada são sintetizados bioquimicamente em unidades de isopreno de 5 carbonos e são geralmente citados como terpenóides. O óleo de fígado de tubarão contém terpenóides ramificados insaturados conhecidos como esqualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que é particularmente aqui preferido. O esqualano, o análogo saturado do esqualeno, também é um óleo preferido. Óleos de peixe, incluindo esqualeno e esqualano, são facilmente disponíveis por fontes comerciais ou podem ser obtidos por métodos conhecidos na técnica. Outros óleos preferidos são os tocoferóis. Podem ser usadas misturas de óleos.

[0063] Quando uma composição inclui um tocoferol, qualquer um dos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou  $\xi$  tocoferóis pode ser usado, mas  $\alpha$ -tocóferóis são preferidos. O tocoferol pode assumir várias formas, por exemplo, diferentes sais e/ou isômeros. Sais incluem sais orgânicos, por exemplo, succinato, acetato, nicotinato etc. Tanto D- $\alpha$ -tocóferol



quanto DL- $\alpha$ -tocoferol podem ser usados. Um  $\alpha$ -tocoferol preferido é DL- $\alpha$ -tocoferol, e o sal preferido desse tocoferol é o succinato.

[0064] Os tensoativos podem ser classificados por seu "FMB" (equilíbrio hidrófilo/lipófilo). Tensoativos da invenção preferidos possuem 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 denominados Tweens), especialmente polissorbato 20 e polissorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) e/ou óxido de butileno (BO), vendidos sob o nome comercial DOWFAX<sup>TM</sup>, por exemplo, copolímeros em bloco lineares EO/PO; octoxinóis, que podem variar no número de grupos de repetição etóxi (oxi-1,2-etanodiil), com octoxinol-9 (Triton X-100, ou t-octilfenoxipolietoxietanol) denso de particular interesse; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolipídeos como, por exemplo, fosfatidilcolina (lecitina); éteres graxos de polioxietileno derivados de alcoóis laurílico, cetílico, estearílico e oleílico (conhecidos como tensoativos Brij), por exemplo, trietilenoglicol monolauril éter (Brij 30); e ésteres de sorbitano (conhecidos comumente como SPANs), por exemplo, trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaurato de sorbitano. Tensoativos preferidos para inclusão na emulsão são Tween 80 (polioxietileno sorbitano monooleato), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina e Triton X-100.

[0065] Podem ser usadas misturas de tensoativos, por exemplo, misturas de Tween 80/Span 85. Uma combinação

de um éster de polioxietileno sorbitano como, por exemplo, polioxietileno sorbitano monooleato (Tween 80), e um octoxinol como, por exemplo, t-octilfenoxipoliethoxietanol (Triton X-100), também é adequada. Outra combinação útil compreende laureth-9 mais um éster de polioxietileno sorbitano e/ou um octoxinol.

[0066] Quantidades preferidas de tensoativos (% por peso) são: ésteres de polioxietileno sorbitano (por exemplo, Tween 80) 0,01 a 1%, em particular cerca de 0,1%; octil- ou nonilfenoxi polioxietanóis (por exemplo, Triton X-100, ou outros detergentes na série Triton) 0,001 a 0,1%, em particular 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (por exemplo, laureth 9) 0,1 a 20%, preferivelmente 0,1 a 10% e, em particular, 0,1 a 1% ou cerca de 0,5%.

[0067] Adjuvantes de emulsão óleo-em-água específicos úteis com a invenção incluem, sem limitação:

- Uma emulsão submícron de esqualeno, Tween 80 e Span 85. A composição da emulsão por volume pode ser de cerca de 5% de esqualeno, cerca de 0,5% de polissorbato 80 e cerca de 0,5% de Span 85. Em termos de peso, essas proporções se tornam 4,3% de esqualeno, 0,5% de polissorbato 80 e 0,48% de Span 85. Esse adjuvante é conhecido como "MF59" [98-100], como descrito com mais detalhes no Capítulo 10 da referência 101 e Capítulo 12 da referência 102. A emulsão MF59 pode incluir íons citrato, por exemplo, 10 mM de tampão de citrato de sódio.

- Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol e Tween 80. A emulsão pode incluir solução salina tamponada com fosfato. Ela também pode incluir Span 85 (por exemplo, a 1%) e/ou 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  $\leq 1$ , na medida em que ela fornece uma emulsão mais estável. Esqualeno e Tween 80 podem estar presentes em uma proporção de volume de cerca de 5:2. Uma emulsão desse tipo pode ser feita por dissolução de Tween 80 em PBS para gerar uma solução a 2%, depois misturando-se 90 ml dessa solução com uma mistura de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol e 5 ml de esqualeno), e depois microfluidificando-se a mistura. A emulsão resultante pode ter gotículas de óleo submícron, por exemplo, com um diâmetro médio entre 100 e 250 nm, preferivelmente cerca de 180 nm.

- Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol e um detergente Triton (por exemplo, Triton X-100). A emulsão também pode incluir um 3d-MPL. A emulsão pode conter um tampão de fosfato.

- Uma emulsão que compreende um polissorbato (por exemplo, polissorbato 80), um detergente Triton (por exemplo, Triton X-100) e um tocoferol (por exemplo, um succinato de  $\alpha$ -tocoferol). A emulsão pode incluir esses três componentes em uma proporção de massa de cerca de 75:11:10 (por exemplo, 750  $\mu\text{g/ml}$  de polissorbato 80, 110  $\mu\text{g/ml}$  de Triton X-100 e 100  $\mu\text{g/ml}$  de succinato de  $\alpha$ -tocoferol), e essas concentrações devem incluir qualquer contribuição desses componentes de antígenos. A emulsão também pode incluir esqualeno. A emulsão também pode incluir um 3d-MPL. A fase aquosa pode conter um tampão de fosfato.

- Uma emulsão de esqualano, polissorbato 80 e poloxâmero 401 ("Pluronic<sup>TM</sup> L121"). A emulsão pode ser

formulada em solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4. Essa emulsão é um veículo liberação útil para muramil dipeptídeos, e tem sido usada com treonil-MDP no adjuvante "SAF-1" [103] (Thr-MDP 0,05-1%, esqualano 5%, Pluronic L121 2,5% e polissorbato 800,2%). Ela também pode ser usada sem o Thr-MDP, como no adjuvante "AF" [104] (esqualano 5%, Pluronic L121 1,25% e polissorbato 80 0,2%). Prefere-se a microfluidificação.

- Uma emulsão que compreende esqualeno, um solvente aquoso, um tensoativo hidrofílico não iônico de alquil éter de polioxietileno (por exemplo, cetoestearil éter de polioxietileno (12)) e um tensoativo hidrofóbico não iônico (por exemplo, um éster de sorbitano ou éster de manida, por exemplo, monooleato de sorbitano ou "Span 80"). A emulsão é preferivelmente termorreversível e/ou possui pelo menos 90% das gotículas de óleo (por volume) com um tamanho de menos de 200 nm [105]. A emulsão também pode incluir um ou mais de: alditol; um agente crioprotetor (por exemplo, um açúcar, por exemplo, dodecilmaltosida e/ou sacarose); e/ou um alquilpoliglicosídeo. Essas emulsões podem ser liofilizadas.

- Uma emulsão que possui de 0,5-50% de um óleo, 0,1-10% de um fosfolipídeo, e 0,05-5% de um tensoativo não iônico. Como descrito na referência 106, componentes fosfolipídicos preferidos são fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina e cardiolipina. Tamanhos de gotículas submícron são vantajosos.

- Uma emulsão óleo-em-água submícron de um óleo não

metabolizável (por exemplo, um óleo mineral leve) e pelo menos um tensoativo (por exemplo, lecitina, Tween 80 ou Span 80). Podem ser incluídos aditivos, por exemplo, saponina QuilA, colesterol, um conjugado saponina-lipófilo (por exemplo, GPI-0100, descrito na referência 107, produzido por adição de amina alifática à desacilsaponina por meio do grupo carboxil de ácido glicurônico), brometo de dimetidioctadecilamônio e/ou N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.

- Uma emulsão que compreende um óleo mineral, um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico, e um tensoativo hidrofílico não iônico (por exemplo, um álcool graxo etoxilado e/ou copolímero em bloco de polioxietileno-polioxipropileno) [108].

- Uma emulsão que compreende um óleo mineral, um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico e um tensoativo lipofílico não iônico (por exemplo, um álcool graxo etoxilado e/ou copolímero em bloco de polioxietileno-polioxipropileno) [108].

- Uma emulsão na qual uma saponina (por exemplo, QuilA ou QS21) e um esterol (por exemplo, um colesterol) estão associados como micelas helicoidais [109].

[0068] Emulsões óleo-em-água podem ser usadas como adjuvantes por elas próprias, ou como veículos para compostos imunoestimuladores posteriores, por exemplo, oligonucleotídeos imunoestimuladores, 3d-MPL etc.

[0069] 3d-MPL (também conhecido como monofosforil lipídeo A 3-des-O-acilado ou 3-O-desacil-4'-monofosforil lipídeo A) é um adjuvante em que a posição 3 da glucosamina da extremidade redutora em monofosforil lipídeo A foi

desacilada. 3d-MPL foi preparada a partir de um mutante sem heptose de *Salmonella minnesota*, e é quimicamente similar ao lipídeo A, mas não possui um grupo fosforil ácido-lábil e um grupo acil base-lábil. A preparação de 3d-MPL foi descrita originalmente na referência 110.

#### **Reconstituição e embalagem**

[0070] Os componentes antigênicos liofilizados da invenção serão, ao final, reconstituídos com um componente líquido para gerar o material adequado à administração a um paciente. A reconstituição tipicamente ocorrerá no momento do uso. Dessa forma, um antígeno e um adjuvante de emulsão óleo-em-água podem ser mantidos separadamente em um kit de vacina embalado ou distribuído, prontos para formulação final no momento de utilização.

[0071] Em um kit que contém dois recipientes, um irá incluir um líquido para reconstituição e o segundo recipiente incluirá material liofilizado. O segundo recipiente normalmente será lacrado hermeticamente. O líquido normalmente será introduzido no segundo recipiente por meio de uma primeira agulha, reconstituindo, dessa forma, o material liofilizado em uma forma líquida. O líquido será então retirado, normalmente para dentro de uma seringa, para administração a um paciente. Essa etapa de retirada pode ser através da primeira agulha, mas frequentemente ocorrerá através de uma segunda agulha. A agulha usada para a retirada pode ser a mesma agulha que é então usada para injeção no paciente, ou pode ser uma agulha diferente.

[0072] O segundo recipiente tipicamente será um frasco. Uma emulsão óleo-em-água para reconstituição do

material liofilizado também pode estar localizada em um frasco, mas, como alternativa, pode estar localizada em uma seringa. Um arranjo adicional possui o primeiro e o segundo recipientes como câmaras separadas em uma seringa de câmara dupla de tal forma que, quando acionada, o material líquido será introduzido do primeiro recipiente no segundo recipiente. Os materiais misturados e reconstituídos podem então sair da seringa em forma líquida. Em todos os casos, no entanto, os materiais liofilizados e líquidos são mantidos separados até estarem prontos para mistura.

[0073] Embora uma emulsão óleo-em-água normalmente seja usada em sua forma líquida, em algumas modalidades da invenção será possível usar um adjuvante liofilizado de emulsão óleo-em-água. A liofilização de adjuvantes de emulsão dessa forma é revelada, por exemplo, nas referências 105 e 111. As emulsões secas ainda serão reconstituídas na forma líquida no momento de utilização, por exemplo, com o uso de um veículo aquoso. O adjuvante liofilizado e os componentes antigênicos liofilizados podem ser componentes separados do kit, mas, em algumas modalidades, eles podem ser misturados (pré- ou pós-liofilização) em forma liofilizada. Dessa forma, em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição que compreende uma mistura de uma emulsão óleo-em-água liofilizada e uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*. Essa composição liofilizada mista pode ser misturada com um veículo aquoso para gerar, em uma etapa de reconstituição, uma composição de Men-B com um adjuvante de emulsão óleo-

em-água.

[0074] Dessa forma, um kit pode compreender, por exemplo, dois frascos, uma seringa já preenchida e um frasco etc. Uma seringa geralmente incluirá uma dose única da composição, enquanto um frasco pode incluir uma dose única ou múltiplas doses. Para formas de múltiplas doses, portanto, frascos são preferidos em relação às seringas pré-preenchidas.

[0075] Materiais líquidos e/ou liofilizados adicionais também podem ser adicionados antes da administração a um paciente.

[0076] Um recipiente para um componente liofilizado pode ter uma tampa (por exemplo, uma *Luer lock*) adaptada de tal forma que uma seringa pré-preenchida possa ser inserida na tampa, o conteúdo da seringa possa ser expelido para dentro do frasco para reconstituir nele o material liofilizado, e o conteúdo do frasco pode ser removido de volta para dentro da seringa. Após remoção da seringa do frasco, uma agulha pode então ser anexada e a vacina pode ser administrada a um paciente. A tampa pode estar localizada dentro de um lacre ou cobertura, de tal forma que o lacre ou cobertura tenha que ser removido antes que a tampa possa ser acessada.

[0077] Quando um componente for embalado em um frasco, este preferivelmente será feito de vidro ou material plástico. O frasco é preferivelmente esterilizado antes que o material seja a ele adicionado. Para evitar problemas com pacientes sensíveis ao látex, os frascos podem ser lacrados com uma tampa sem látex. O frasco pode incluir uma dose única de vacina, ou mais de uma dose (um



frasco "multidoses"), por exemplo, 10 doses. Frascos preferidos são feitos de vidro incolor.

[0078] Quando a vacina for embalada em uma seringa, a seringa poderá ter uma agulha a ela anexada, ou ela poderá não ter agulha. Uma agulha separada pode ser fornecida com a seringa para montagem e uso. Agulhas de segurança são preferidas. Agulhas de 2,54 cm 23 gauge, 2,54 cm 25 gauge e 1,58 cm 25 gauge são típicas. As seringas podem ser fornecidas com rótulos destacáveis nos quais o número de lote e a data de validade do conteúdo podem ser impressos, para facilitar o gerenciamento de registros. O êmbolo na seringa preferivelmente possui uma rolha para evitar que o êmbolo seja removido acidentalmente durante a aspiração.

[0079] Quando um recipiente de vidro (por exemplo, uma seringa ou um frasco) é usado, prefere-se usar um recipiente feito de um vidro de borossilicato, e não um de cal sodada.

[0080] As vacinas são normalmente administradas aos pacientes em doses de 0,5 ml, e o volume do líquido no primeiro recipiente será adequado para gerar um volume de dosagem após reconstituição de pelo menos 0,5 ml, por exemplo, 0,6 ml, incluindo o volume desperdiçado.

[0081] Por razões de estabilidade, o componente liofilizado da invenção pode incluir um estabilizante como, por exemplo, lactose, sacarose e/ou manitol, bem como misturas destes, por exemplo, misturas de lactose/sacarose, misturas de sacarose/manitol etc. A utilização de uma mistura de sacarose/manitol pode acelerar o processo de secagem. Um componente liofilizado também pode incluir

cloreto de sódio. Componentes solúveis no material liofilizado serão retidos na composição após reconstituição e, portanto, as vacinas líquidas finais podem conter lactose e/ou sacarose.

[0082] Uma composição pode incluir um agente de proteção contra temperatura, como descrito na referência 112. Exemplos incluem glicerina, propileno glicol e/ou polietileno glicol (PEG). PEGs adequados podem ter um peso molecular médio que varia de 200-20.000 Da. Em uma modalidade preferida, o polietileno glicol pode ter um peso molecular médio de cerca de 300 Da ("PEG-300").

#### **Composições farmacêuticas**

[0083] Os materiais da invenção ao final serão usados para preparar composições farmacêuticas para administração a um paciente. Elas tipicamente incluirão um veículo farmacêuticamente aceitável. Uma discussão detalhada de veículos farmacêuticamente aceitáveis está disponível na referência 113.

[0084] Volumes de dosagem eficazes podem ser estabelecidos rotineiramente, mas uma dose humana típica da composição possui um volume de cerca de 0,5 ml, por exemplo, para injeção intramuscular. A vacina à base de OMV RIVM foi administrada em um volume de 0,5 ml [114] por injeção intramuscular na coxa ou no braço. MeNZB<sup>TM</sup> é administrada em um volume de 0,5 ml por injeção intramuscular na região anterolateral da coxa ou na região deltóide do braço. Doses similares podem ser usadas para outras vias de liberação, por exemplo, uma vacina intranasal à base de OMV para atomização pode possuir um volume de cerca de 100 µl ou cerca de 130 µl por spray, com

quatro sprays administrados para gerar uma dose total de cerca de 0,5 ml.

[0085] O pH de uma composição após reconstituição preferivelmente é entre 6 e 8 e, mais preferivelmente, entre 6,5 e 7,5 (por exemplo, cerca de 7). O pH da vacina à base de OMV RIVM é de 7,4 [115], e um pH <7,5 é preferido para as composições da invenção. A vacina à base de OMV RIVM mantém o pH pela utilização de 10 mM de tampão Tris/HCl, e o pH estável em composições da invenção pode ser mantido pelo uso de um tampão, por exemplo, um tampão Tris, um tampão de citrato, tampão de fosfato ou um tampão de histidina. Dessa forma, as composições da invenção geralmente incluirão um tampão. Os componentes do tampão estarão localizados no componente líquido e/ou no componente liofilizado, como for adequado, para gerar o arranjo pós-reconstituição final desejado.

[0086] A composição pode ser estéril e/ou livre de pirogênio. As composições da invenção podem ser isotônicas com relação aos seres humanos.

[0087] As composições da invenção para administração aos pacientes são imunogênicas, e são mais preferivelmente composições de vacina. As vacinas de acordo com a invenção podem ser profiláticas (ou seja, para evitar a infecção) ou terapêuticas (ou seja, para tratar a infecção), mas tipicamente serão profiláticas. As composições imunogênicas usadas como vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de antígeno(s), bem como quaisquer outros componentes, como necessário. O termo "quantidade imunologicamente eficaz" significa que a administração daquela quantidade a um indivíduo, tanto em

uma dose única quanto como parte de uma série, é eficaz para o tratamento ou prevenção. Essa quantidade varia, dependendo da condição de saúde e física do indivíduo a ser tratado, da idade, do grupo taxonômico do indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata etc.), da capacidade do sistema imunológico do indivíduo para sintetizar anticorpos, do grau de proteção desejado, da formulação da vacina, da avaliação da situação clínica pelo médico responsável e de outros fatores relevantes. Espera-se que a quantidade caia em uma faixa relativamente ampla que pode ser determinada por meio de experimentos de rotina. O teor de antígeno das composições da invenção geralmente será expresso em termos da quantidade de proteína por dose. Uma dose de cerca de 0,9 mg de proteína por ml é típica para vacinas intranasais à base de OMV.

[0088] Meningococos afetam várias áreas do corpo e, portanto, as composições da invenção, podem ser preparadas em várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injetáveis, como soluções ou suspensões. A composição pode ser preparada para administração pulmonar, por exemplo, por um inalante, usando um spray fino. A composição pode ser preparada para administração nasal, auricular ou ocular, por exemplo, como spray ou gotas. Injetáveis para administração intramuscular são típicos.

[0089] As composições da invenção podem incluir um antimicrobiano, particularmente quando embaladas em formato de doses múltiplas. Antimicrobianos como timerosal e 2-fenoxietanol são comumente encontrados em vacinas, mas prefere-se utilizar um conservante sem mercúrio ou nenhum conservante.

[0090] Um componente liofilizado da invenção e/ou um adjuvante de emulsão óleo-em-água co-embalado podem ser substancialmente livres de sais de alumínio. Esse arranjo permite que uma composição reconstituída da invenção seja substancialmente livre de sais de alumínio.

[0091] As composições da invenção podem compreender detergente, por exemplo, um Tween (polissorbato), por exemplo, Tween 80. Detergentes estão geralmente presentes em níveis baixos, por exemplo, <0,01%.

[0092] As composições da invenção podem incluir detergente residual (por exemplo, desoxicolato) da preparação de OMV. A quantidade de residual detergente é preferivelmente de menos de 0,4 µg (mais preferivelmente, menos de 0,2 µg) para cada µg de proteína de Men-B.

[0093] As composições da invenção podem incluir LOS de meningococo. A quantidade de LOS é preferivelmente menor do que 0,12 µg (mais preferivelmente menor do que 0,05 µg) para cada µg de proteína.

[0094] As composições da invenção podem incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio) para dar tonicidade. A concentração de  $10 \pm 2$  mg/ml de NaCl é típica, por exemplo, cerca de 9 mg/ml.

#### **Métodos de tratamento**

[0095] A invenção também fornece um método para despertar uma resposta de anticorpo em um mamífero, que compreende a administração de uma composição farmacêutica líquida da invenção ao mamífero. A resposta imunológica é preferivelmente protetora e preferivelmente envolve anticorpos. O método pode despertar uma resposta de reforço em um paciente que já foi imunizado contra *N. meningitidis*.

Regimes de sensibilização/reforço subcutâneos e intranasais de imunização primária/de reforço para OMVs são apresentados na referência 116.

[0096] O mamífero é preferivelmente um humano. Quando a vacina for para uso profilático, o humano será preferivelmente uma criança (por exemplo, uma criança pequena ou um bebê) ou um adolescente; quando a vacina for para uso terapêutico, o humano será preferivelmente um adulto. Uma vacina destinada às crianças também pode ser administrada aos adultos, por exemplo, para avaliar segurança, dosagem, imunogenicidade etc.

[0097] A invenção também fornece composições e misturas da invenção para uso como um medicamento. O medicamento é preferivelmente capaz de despertar uma resposta imunológica em um mamífero (ou seja, ela é uma composição imunogênica) e é, mais preferivelmente, uma vacina.

[0098] A invenção também fornece o uso de composições e misturas da invenção na fabricação de um medicamento para despertar uma resposta imunológica em um mamífero. A invenção também fornece o uso de (i) um adjuvante que compreende uma emulsão óleo-em-água; e (ii) uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra o sorogrupo B de *N. meningitidis* na fabricação de um medicamento para despertar uma resposta imunológica em um mamífero. O uso também pode envolver (iii) um sacarídeo capsular conjugado de um ou mais dos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y de *N. meningitidis*.

[0099] Esses usos e métodos são preferivelmente

para a prevenção e/ou tratamento de uma doença causada por *N. meningitidis*, por exemplo, meningite bacteriana (ou, mais especificamente, meningocócica), ou septicemia.

[00100] Uma forma de verificar a eficácia do tratamento terapêutico envolve o monitoramento da infecção por *Neisseria* após administração da composição da invenção. Uma forma de verificar a eficácia do tratamento profilático envolve o monitoramento das respostas imunológicas contra os antígenos após administração da composição. A imunogenicidade de composições da invenção pode ser determinada administrando-as a indivíduos de teste (por exemplo, crianças com 12-16 meses de idade ou modelos animais [117]) e depois determinando-se parâmetros-padrão, incluindo anticorpos séricos bactericidas (SBA) e titulações de ELISA (GMT). Essas respostas imunológicas serão determinadas geralmente em torno de 4 semanas após a administração da composição, e comparadas com os valores obtidos antes da administração da composição. Um aumento de SBA de pelo menos 4 ou 8 vezes é preferido. Quando for administrada mais de uma dose da composição, poderá ser feita mais de uma determinação pós-administração.

[00101] Em geral, as composições da invenção são capazes de induzir respostas séricas bactericidas de anticorpos após serem administradas a um indivíduo. Essas respostas são medidas convenientemente em camundongos e são um indicador-padrão de eficácia da vacina. A atividade bactericida sérica (SBA) mede a morte bacteriana mediada por complemento, e pode ser testada usando complemento humano ou de filhote de coelho. Os padrões da Organização Mundial de Saúde (OMS) exigem que uma vacina induza um

aumento de pelo menos 4 vezes na SBA em mais de 90% dos receptores. MeNZB<sup>TM</sup> desperta um aumento de 4 vezes na SBA 4-6 semanas após administração da terceira dose.

[00102] As composições preferidas da invenção podem conferir uma titulação de anticorpos em um paciente humano que seja superior ao critério para soroproteção para uma percentagem aceitável de indivíduos. Antígenos com uma titulação associada de anticorpos acima da qual um hospedeiro é considerado como sendo soro-convertido contra o antígeno são bem conhecidos, e tais titulações são publicadas por organizações como a OMS. Preferivelmente, mais de 80% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos são soro-convertidos, mais preferivelmente mais de 90%, ainda mais preferivelmente, mais de 93% e, principalmente, 96-100%.

[00103] As composições da invenção geralmente serão administradas diretamente a um paciente. A liberação direta pode ser obtida por injeção parenteral (por exemplo, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular ou no espaço intersticial de um tecido) ou por qualquer outra via adequada. A invenção pode ser usada para despertar imunidade sistêmica e/ou mucosa. Prefere-se a administração intramuscular na coxa ou na região superior do braço. A injeção pode ser feita através de uma agulha (por exemplo, uma agulha hipodérmica), mas uma injeção sem agulha pode, alternativamente, ser usada. Uma dose intramuscular típica é de 0,5 ml.

[00104] A dosagem do tratamento pode ser um esquema de dose única ou um esquema de doses múltiplas. Podem ser usadas doses múltiplas em um esquema de imunização primária



e/ou em um esquema de imunização de reforço. Um esquema de dose primária pode ser seguido por um esquema de dose de reforço. O momento adequado entre doses primárias (por exemplo, entre 4-16 semanas) e entre as doses primárias e de reforço pode ser determinado rotineiramente. A vacina à base de OMV RIVM foi testada usando um esquema de 3 ou 4 doses primárias, com vacinação em 0, 2 e 8 ou 0, 1, 2 e 8 meses. MeNZB<sup>TM</sup> é administrada em três doses em intervalos de seis semanas.

[00105] As composições da invenção podem ser usadas para induzir respostas de anticorpos bactericidas contra mais de uma linhagem hipervirulenta de meningococo. Em particular, elas podem preferivelmente induzir respostas bactericidas contra duas ou três das três seguintes linhagens hipervirulentas: (i) *cluster* A4; (ii) complexo ET5; e (iii) linhagem 3. Elas podem ainda induzir respostas de anticorpos bactericidas contra uma ou mais das linhagens hipervirulentas subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 ou complexo ET-37, e contra outras linhagens, por exemplo, linhagens hiperinvasivas. Isso não significa necessariamente que a composição pode induzir anticorpos bactericidas contra cada uma e todas as cepas de meningococo dentro dessas linhagens hipervirulentas, por exemplo, em vez disso, para certo grupo de quatro ou mais cepas de meningococo dentro de uma linhagem hipervirulenta em particular, os anticorpos induzidos pela composição são bactericidas contra pelo menos 50% (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais) do grupo. Grupos de cepas preferidos incluirão cepas isoladas em pelo menos quatro dos seguintes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR e CU. O soro

preferivelmente possui uma titulação bactericida de pelo menos 1024 (por exemplo,  $2^{10}$ ,  $2^{11}$ ,  $2^{12}$ ,  $2^{13}$ ,  $2^{14}$ ,  $2^{15}$ ,  $2^{16}$ ,  $2^{17}$ ,  $2^{18}$  ou mais, preferivelmente pelo menos  $2^{14}$ ); por exemplo, o soro é capaz de matar pelo menos 50% das bactérias de teste de uma cepa em particular quando diluído a 1/1.024.

[00106] Composições úteis podem induzir respostas bactericidas contra as seguintes cepas de meningococo do sorogrupo B: (i) do *cluster* A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21,16) e/ou cepa G2136 (B:-); (ii) do complexo ET-5, cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) e/ou cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) da linhagem 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) e/ou cepa BZ198 (B:NT:-). Composições mais preferidas podem induzir respostas bactericidas contra cepas 961-5945, 44/76 e 394/98.

[00107] As cepas 961-5945 e G2136 são, ambas, cepas de *Neisseria* MLST de referência [ids. 638 e 1.002 na referência 118]. A cepa MC58 é amplamente disponível (por exemplo, ATCC BAA-335) e foi a cepa sequenciada na referência 119. A cepa 44/76 foi amplamente usada e caracterizada (por exemplo, referência 120) e é uma das cepas de *Neisseria* MLST de referência [id. 237 na referência 118; fileira 32 da Tabela 2 na referência 19]. A cepa 394/98 foi originalmente isolada na Nova Zelândia em 1998, e houve vários trabalhos publicados com o uso dessa cepa (por exemplo, as referências 121 e 122). A cepa BZ198 é outra cepa de referência MLST (id. 409 na referência 118; fileira 41 da Tabela 2 na referência 19).

#### **Composições adicionais da invenção**

[00108] A invenção fornece uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma

resposta imunológica contra o sorogrupo B de *N. meningitidis*, em que o imunógeno compreende vesículas da membrana externa de Men-B, como descrito acima, desde que a composição não inclua vesículas de qualquer uma das cepas: F91; JB10124; ou HP 10124.

[00109] A invenção fornece uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra sorogrupo B de *N. meningitidis*, em que o imunógeno compreende vesículas da membrana externa de Men-B como descrito acima, em que as vesículas são de uma cepa com um imunotipo L2 ou L3. A composição pode incluir vesículas de uma cepa L2 e L3.

[00110] A invenção fornece uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra sorogrupo B de *N. meningitidis*, em que o imunógeno compreende vesículas da membrana externa de Men-B como descrito acima, em que as vesículas incluem LOS que não inclui um epitopo de sialil-lacto-N-neotetraose.

[00111] A invenção fornece uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra sorogrupo B de *N. meningitidis*, em que o imunógeno compreende uma proteína fHBP purificada. A composição pode incluir mais de uma variante de fHBP, como descrito acima.

[00112] Essas composições liofilizadas são adequadas à reconstituição por um adjuvante que compreende uma emulsão óleo-em-água, e são, dessa forma, adequadas para uso como componentes do kit da invenção ou para uso nos métodos da invenção etc. Como podem ser vendidas ou

distribuídas sem adjuvantes de emulsão, no entanto, elas são modalidades independentes da invenção. Elas podem, no entanto, ser embaladas na forma de kit em combinação com outro recipiente que compreende um adjuvante líquido. Esse adjuvante líquido preferivelmente compreende uma emulsão óleo-em-água.

[00113] A invenção também fornece uma composição antigênica com adjuvante que compreende vesículas da membrana de sorogrupo B de *N. meningitidis* e uma emulsão óleo-em-água submícron. A emulsão preferivelmente compreende esqualeno e/ou polissorbato 80. As gotículas de óleo da emulsão possuem idealmente <500 nm de diâmetro. As vesículas podem superexpressar uma ou mais proteínas, como discutido acima, e/ou podem incluir uma ou mais das mutações *knockout*, como discutido acima, por exemplo, LgtB e/ou GalE infra-regulado ou *knocked-out* para truncar LOS, TbpA supra-regulado etc. A conjugação "intra-bolha" pode ser usada. Essa composição com adjuvante pode ser preparada por mistura de antígenos liofilizados com uma emulsão, como descrito acima ou, em contraste, pode ser preparada com a utilização de uma preparação de vesícula aquosa.

#### **Componentes antigênicos adicionais**

[00114] Além de conter antígenos de *N. meningitidis*, as composições podem incluir antígenos de patógenos adicionais. Por exemplo, a composição pode compreender um ou mais dos seguintes antígenos adicionais:

- um antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, por exemplo, um sacarídeo (tipicamente conjugado).
- um antígeno do vírus da hepatite B, por exemplo, o antígeno de superfície HBsAg.

- um antígeno de *Bordetella pertussis*, por exemplo, holotoxina de pertussis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou aglutinógenos 2 e 3.

- um antígeno diftérico, por exemplo, um toxóide diftérico.

- um antígeno tetânico, por exemplo, um toxóide tetânico.

- um antígeno sacarídico de *Haemophilus influenzae* B (Hib), tipicamente conjugado.

- antígenos inativados de poliovírus.

[00115] Esses antígenos adicionais podem ser incluídos em forma líquida no mesmo recipiente que a emulsão óleo-em-água, em forma liofilizada no mesmo recipiente que o antígeno de Men-B liofilizado, ou em um terceiro recipiente (na forma liofilizada ou, normalmente, em forma líquida).

[00116] Quando um antígeno diftérico é incluído na composição, prefere-se também incluir antígeno tetânico e antígenos de pertussis. Similarmente, quando um antígeno tetânico é incluído, prefere-se também incluir antígenos de difteria e de pertussis. Similarmente, quando um antígeno de pertussis é incluído, prefere-se também incluir antígenos diftéricos e tetânicos. Dessa forma, são preferidas combinações de DTP.

[00117] Se um sacarídeo de Hib for incluído (tipicamente como um conjugado), a porção sacarídica pode ser um polissacarídeo (por exemplo, fosfato de polirribosilribitol de comprimento total (PRP) como purificado de bactérias), mas também é possível fragmentar

o sacarídeo purificado para a produção de oligossacarídeos (por exemplo, com peso molecular de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 kDa), por exemplo, por hidrólise. A concentração de conjugado de Hib na vacina reconstituída normalmente estará na faixa de 0,5 µg a 50 µg, por exemplo, de 1-20 µg, de 10-15 µg, de 12-16 µg etc. A quantidade pode ser de cerca de 15 µg, ou cerca de 12,5 µg em algumas modalidades. Uma massa de menos do que 5 µg pode ser adequada [123], por exemplo, na faixa de 1-5 µg, 2-4 µg ou cerca de 2,5 µg. Como descrito acima, em combinações que incluem sacarídeo de Hib e sacarídeos meningocócicos, a dose do primeiro pode ser selecionada com base na dose dos últimos (em particular, com múltiplos sorogrupos meningocócicos, sua massa média). Características adicionais dos conjugados de Hib são como reveladas acima para os conjugados meningocócicos, incluindo a escolha da proteína de transporte (por exemplo, CRM197 ou toxóide tetânico), ligações, proporções etc.

[00118] Caso um antígeno de *S. pneumoniae* seja incluído, esse poderá ser um polipeptídeo ou um sacarídeo. Sacarídeos capsulares conjugados são particularmente úteis para imunização contra pneumococo. O sacarídeo pode ser um polissacarídeo que possui o tamanho que surge durante a purificação do sacarídeo de bactérias, ou ele pode ser um oligossacarídeo obtido por fragmentação desse polissacarídeo. No produto 7-valente PREVNAR™, por exemplo, 6 dos sacarídeos são apresentados como polissacarídeos intactos, enquanto um (o sorotipo 18C) é apresentado como um oligossacarídeo. Uma composição pode incluir um sacarídeo capsular de um ou mais dos seguintes

sorotipos pneumocócicos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e/ou 33F. Uma composição pode incluir múltiplos sorotipos, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou mais sorotipos. Combinações conjugadas 7-valentes, 9-valentes, 10-valentes, 11-valentes e 13-valentes já são conhecidas na técnica, bem como uma combinação não conjugada 23-valente. Por exemplo, uma combinação 10-valente pode incluir sacarídeo dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Uma combinação 11-valente pode ainda incluir sacarídeo do sorotipo 3. Uma combinação 12-valente pode ser adicionada à mistura 10-valente: sorotipos 6A e 19A; 6A e 22F; 19A e 22F; 6A e 15B; 19A e 15B; e 22F e 15B; uma combinação 13-valente pode ser adicionada à mistura 11-valente: sorotipos 19A e 22F; 8 e 12F; 8 e 15B; 3 e 19A; 8 e 22F; 12F e 15B; 12F e 19A; 12F e 22F; 15B e 19A; 15B e 22F etc. Características adicionais de conjugados pneumocócicos são como reveladas acima para os conjugados meningocócicos, incluindo a escolha da proteína de transporte (por exemplo, CRM197 ou toxóide tetânico), ligações, proporções etc. Quando uma composição incluir mais de um conjugado, cada conjugado poderá usar a mesma proteína de transporte ou uma proteína de transporte diferente. A referência 124 descreve vantagens potenciais quando se utilizam diferentes proteínas de transporte em vacinas conjugadas pneumocócicas multivalentes.

### **Geral**

[00119] 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 mais, por exemplo, X + Y.

[00120] O termo "cerca de", em relação a um valor numérico x, significa, por exemplo,  $x \pm 10\%$ .

[00121] A palavra "substancialmente" não exclui "completamente"; por exemplo, uma composição que seja "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**

[00122] A Figura 1 mostra dois traços analíticos superpostos para uma composição da invenção. As linhas são uma composição pré-liofilização e uma pós-reconstituição. Basicamente somente uma linha é visível, pois elas são muito similares.

[00123] A Figura 2 mostra dois traços analíticos superpostos para uma composição armazenada a 4°C e uma composição armazenada a 37°C. Diferentemente da Figura 1, duas linhas são visíveis.

[00124] A Figura 3 mostra análise SDS-PAGE de várias formulações. As 10 raias, da esquerda para a direita, mostram: (1) marcador de peso molecular; (2)-(4) antígenos líquidos a 100 µg/ml, 50 µg /ml e 25 µg /ml; (5) antígenos em mistura de manitol 2% e sacarose 3%, antes da liofilização; (6) como raia (5), mas após liofilização e reconstituição com água para injeção; (7) como raia (5), mas após liofilização e reconstituição com MF59; (8) a (10) como raias (5) a (7), mas em sacarose 5%.

#### **MODOS PARA REALIZAR A INVENÇÃO**

##### **Inclusão de adjuvante na vacina de Men-B**



[00125] A avaliação pré-clínica inicial da vacina de Men-B da Novartis indicou que uma resposta imunológica ótima necessitava da presença de adjuvante de hidróxido de alumínio. Até mesmo na presença desse adjuvante, no entanto, a cobertura de cepas era incompleta. Por exemplo, enquanto 100% das cepas ST32 e ST8 testadas fossem mortos por soros despertados pela vacina, esse número caía para 65% para as cepas ST11. Em contraste, o uso da emulsão MF59 como adjuvante forneceu 100% de cobertura para todas as cepas ST32, ST8 e ST11. Experimentos adicionais confirmaram a superioridade de MF59.

[00126] A mesma superioridade foi observada quando sacarídeos capsulares conjugados dos sorogrupos A, C, W135 e Y foram adicionados à vacina de Men-B. A imunogenicidade obtida por essa vacina A-B-C-W-Y foi melhor quando se utilizou MF59 do que quando se utilizou hidróxido de alumínio, tanto em termos de titulações bactericidas quanto de cobertura de cepas.

[00127] Dessa forma, MF59 fornece uma eficácia imunogênica aumentada quando comparado com o adjuvante de hidróxido de alumínio. Quando a estabilidade deste foi testada, no entanto, verificou-se que os antígenos de Men-B começavam a se degradar após aproximadamente 12 semanas, até mesmo quando armazenados a 4°C. Quando armazenados em temperaturas mais elevadas, a degradação era evidente após somente 2 semanas, com a degradação completa após 6 meses. A análise com o uso do aparelho "Agilent 2100 Bioanalyzer" ou cromatografia por exclusão de tamanho confirmou a degradação. Em contraste, os antígenos permaneceram estáveis quando adsorvidos ao hidróxido de alumínio.

[00128] A estabilidade reduzida também foi observada para sacarídeos capsulares conjugados de sorogrupos não B em MF59. O nível de ácido siálico livre (um componente nos sacarídeos capsulares de Men-C, Men-W135 e Men-Y) se eleva gradualmente em uma formulação com adjuvante MF59 armazenada a 4°C, alcançando em torno de 15% após 6 meses. Em temperaturas mais elevadas, no entanto, o nível livre alcançou 50% após aproximadamente 10 semanas e 100% (ou seja, degradação total) em 6 meses.

[00129] Dessa forma, a imunogenicidade aumentada obtida por MF59 se dá às custas da estabilidade ao armazenamento. Foi realizado um trabalho para ver se uma formulação estável poderia ser obtida usando MF59 e/ou sem necessitar da adsorção a um adjuvante de hidróxido de alumínio.

#### **Liofilização de Men-B**

[00130] Em uma tentativa de se obter o objetivo da estabilidade, os antígenos de Men-B foram liofilizados. Após reconstituição, foi confirmado que sua eficácia era retida. Além disso, foi observada estabilidade para misturas de antígenos de Men-B com sacarídeos capsulares conjugados de cada um dos sorogrupos A, C, W135 e Y.

[00131] Por exemplo, a Figura 1 mostra dois traços analíticos superpostos, com os picos que correspondem à posições de eluição das proteínas de Men-B. Os traços são quase idênticos, revelando ausência de alteração físico-química substancial. Em contraste, a Figura 2 mostra dois traços superpostos da mesma composição armazenada a 4°C ou 37°C, e as alterações são facilmente visíveis. Outras técnicas analíticas confirmaram a ausência de quaisquer

alterações detectáveis pré- e pós-liofilização. A integridade dos antígenos de Men-B individuais pareceu estar conservada, até mesmo após 6 meses de armazenamento pós-liofilização a 4°C.

[00132] As composições foram liofilizadas na presença de manitol 4,5% e sacarose 1,5%.

[00133] Dessa forma, a estabilidade de longo prazo dos antígenos meningocócicos pode ser obtida sem a necessidade de adsorção a um sal de alumínio. Dessa forma, a liofilização permite que os antígenos sejam usados em combinação com uma emulsão óleo-em-água, fornecendo, dessa forma, uma eficácia e cobertura de cepas aumentadas que foram demonstradas para esses adjuvantes, evitando, ao mesmo tempo, os problemas de estabilidade associados.

#### **Formulações adicionais**

[00134] Em um trabalho de desenvolvimento adicional para uma apresentação liofilizada da vacina de Men-B, foram preparadas duas formulações da vacina de proteína recombinante. Ambas usaram sacarose como estabilizador da liofilização, mas uma incluía adicionalmente manitol. A osmolaridade é de 300 mOsmU e o pH de 7,0. Cada frasco inclui material suficiente para uma dose humana com um excesso de 40% (70 µg de cada proteína recombinante, 15 mg de PBS, e 14 mg de manitol ou 21 mg de manitol + 35 mg de sacarose), e serão reconstituídas com 700 µl de água de MF59 (ou, para comparação, com água para injeção).

[00135] Os níveis de umidade foram medidos imediatamente após liofilização e depois por um mês em temperaturas baixas ou elevadas. O teor de umidade permaneceu constante em torno de 1,1%.

[00136] Uma comparação dos traços de RP-HPLC antes da liofilização e depois da reconstituição mostrou que as proteínas em ambas as formulações permaneceram estáveis após a liofilização, até mesmo por 1 mês a 37°C. SDS-PAGE (Figura 3) e *western blots* também mostraram que as três proteínas eram estáveis após o processo de liofilização, sem evidências de degradação ou agregação após reconstituição com MF59 ou água para injeção, tanto a 4°C quanto a 37°C. A análise *Experion* gerou o mesmo resultado. A cromatografia por exclusão de tamanho mostrou que a liofilização causou um pequeno aumento na agregação, mas a quantidade de agregado não aumentou posteriormente, até mesmo após 3 meses a 37°C ou 6 meses a 4°C.

#### **Estudos de imunogenicidade**

[00137] Foram usados camundongos em um estudo de imunogenicidade para avaliar o efeito da liofilização sobre a potência da vacina. As formulações liofilizadas foram reconstituídas com MF59 e as titulações foram comparadas contra os mesmos antígenos na forma líquida e misturadas extemporaneamente com MF59 (como em uma abordagem "de dois frascos"). As formulações induziram titulações similares.

[00138] Para estudar a estabilidade em prazo mais longo, duas preparações de antígenos liofilizados (uma liofilizada com sacarose, a outra com sacarose + manitol) foram armazenadas a 4°C, e suas imunogenicidades foram testadas após 3 e 6 meses de armazenamento. Os antígenos armazenados foram reconstituídos com MF59 (também armazenado a 4°C com os antígenos) e rapidamente usados para imunização. Para comparação, antígenos aquosos e MF59 recém preparados também foram misturados e testados em

paralelo.

[00139] Os resultados de ELISA de dois estudos separados indicaram que as formulações liofilizadas, quando reconstituídas com MF59, induziram titulações de anticorpo similares (GMT) àquelas despertadas pela formulação recém preparada. O mesmo foi observado quando as respostas de anticorpo foram testadas por SBA, por exemplo, uma titulação de SBA de 32.768 foi observada no momento zero com o antígeno liofilizado com sacarose, e ainda era observada após 6 meses de armazenamento. Dessa forma, os antígenos de Men-B permanecem ativos após liofilização e armazenamento.

[00140] Em estudos adicionais, as preparações liofilizadas foram armazenadas a 4°C ou 37°C, e a imunogenicidade foi então testada. Até mesmo após 1 mês de armazenamento a 37°C, os antígenos liofilizados não apresentaram perda da atividade de SBA.

**Estabilidade do tamanho da emulsão misturada com antígenos liofilizados de Men-B**

[00141] O tamanho da gotícula de óleo de uma emulsão MF59 foi medido ao longo de um período de 24 horas a 4°C e 25°C, tanto como emulsão isoladamente quanto misturada com antígenos liofilizados de Men-B, ou misturada com um antígeno de controle. Os tamanhos da gotícula (nm) foram os seguintes:

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>25</b>				<b>4</b>	
Tempo (horas) :	0	3	5	24	0	24
MF59	171	169	172	168	172	170

isoladamente						
MF59 + Ag de controle	173	170	167	172	169	172
MF59 + Men-B <sub>liofilizado</sub>	169	168	176	170	173	171

[00142] Dessa forma, o tamanho de partícula da emulsão na presença dos antígenos liofilizados de Men-B é estável por 24 horas a 4°C ou 25°C e é basicamente o mesmo que da própria emulsão.

[00143] Será subentendido que a invenção foi descrita apenas como forma de exemplo, e que podem ser feitas modificações que permanecem dentro do escopo e espírito da invenção.

#### **REFERÊNCIAS**

[1] Giuliani e cols. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(29): 10.834-9.

[2] Boutriau e cols. (2007) *Clin. Vaccin. Immunol.* 14: 65-73.

[3] WO 99/61053.

[4] WO 00/50075.

[5] WO 2006/100109.

[6] Shi e Schofield (2004) *Exp. Opin. Drug. Safety* 3: 153-8.

[7] Belshe e cols. (1998) *AIDS*. 12(18): 2.407-15.

[8] Afigita e cols. (2004) *Vaccine* 22: 629-42.

[9] Granoff e cols. (1997) *Infect. Immun.* 65: 1.710-5.

[10] WO 02/09643.

[11] Katial e cols. (2002) *Infect. Immun.* 70: 702-707.

[12] Patente U.S. 6.180.111.

[13] WO 01/34642.

- [14] WO 2004/019977.
- [15] Patente Européia 0011243.
- [16] Fredriksen e cols. (1991) *NIPH Ann.* 14(2): 67-80.
- [17] WO 01/91788.
- [18] WO 2005/004908.
- [19] Maiden e cols. (1998) *PNAS USA* 95: 3.140-3.145.
- [20] WO 98/56901.
- [21] WO 2006/081259.
- [22] Claassen e cols. (1996) 14(10):1001-8.
- [23] WO 99/10497.
- [24] Steeghs e cols. (2001) *The EMBO Journal* 20:  
6.937-6.945.
- [25] WO 00/25811.
- [26] WO 01/09350.
- [27] WO 02/09746.
- [28] WO 02/062378.
- [29] WO 2004/014417.
- [30] WO 03/105890.
- [31] WO 2006/024946.
- [32] WO 99/24578.
- [33] WO 99/36544.
- [34] WO 99/57280.
- [35] WO 00/22430.
- [36] WO 96/29412.
- [37] WO 01/64920.
- [38] WO 03/020756.
- [39] WO 2004/048404.
- [40] WO 2004/032958.
- [41] WO 98/53851.
- [42] US-6531131.

- [43] WO 00/26384.
- [44] US-6645503.
- [45] WO 01/52885.
- [46] Costantino e cols. (1992) *Vaccine* 10: 691-8.
- [47] Lieberman e cols. (1996) *JAMA* 275: 1.499-503.
- [48] WO 02/058737.
- [49] WO 03/007985.
- [50] Rennels e cols. (2002) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21: 978-979.
- [51] Campbell e cols. (2002) *J. Infect. Dis.* 186: 1.848-1.851.
- [52] WO 03/080678.
- [53] Glode e cols. (1979) *J. Infect. Dis.* 139: 52-56.
- [54] WO 94/05325; Patente U.S. 5.425.946.
- [55] Arakere e Frasch (1991) *Infect. Immun.* 59: 4.349-4.356.
- [56] Michon e cols. (2000) *Dev. Biol.* 103: 151-160.
- [57] Rubinstein e Stein (1998) *J. Immunol.* 141: 4.357-4.362.
- [58] WO 2005/033148.
- [59] WO 2007/000314.
- [60] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002).
- [61] EP-A-0372501.
- [62] EP-A-0378881.
- [63] EP-A-0427347.
- [64] WO 93/17712.
- [65] WO 94/03208.
- [66] WO 98/58668.
- [67] EP-A-0471177.
- [68] WO 91/01146.



- [69] Falugi e cols. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31: 3.816-3.824.
- [70] Baraldo e cols. (2004) *Infect Immun.* 72(8): 4.884-7.
- [71] EP-A-0594610.
- [72] Ruan e cols. (1990) *J. Immunol.* 145: 3.379-3.384.
- [73] WO 00/56360.
- [74] Kuo e cols. (1995) *Infect Immunol.* 63: 2.706-13.
- [75] Michon e cols. (1998) *Vaccine.* 16: 1.732-41.
- [76] WO 02/091998.
- [77] WO 01/72337.
- [78] WO 00/61761.
- [79] WO 00/33882.
- [80] WO 99/42130.
- [81] WO 2007/000341.
- [82] Bardotti e cols. (2008) *Vaccine* 26: 2.284-96.
- [83] *Mol. Immunol.*, 1985, 22, 907-919.
- [84] EP-A-0208375.
- [85] Bethell G.S. e cols., *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 2.572-4.
- [86] Hearn M.T.W., *J. Chromatogr.*, 1981, 218, 509-18.
- [87] WO 00/10599.
- [88] Geyer e cols., *Med. Microbiol. Immunol.*, 165: 171-288 (1979).
- [89] Patente U.S. 4.057.685.
- [90] Patentes U.S. 4.673.574, 4.761.283, 4.808.700.
- [91] Patente U.S. 4.459.286.
- [92] Patente U.S. 5.204.098.
- [93] Patente U.S. 4.965.338.
- [94] Patente U.S. 4.663.160.

- [95] WO 2007/000343.
- [96] WO 2007/000342.
- [97] WO 2007/000322.
- [98] WO 90/14837.
- [99] Podda e Del Giudice (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2: 197-203.
- [100] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2.673-2.680.
- [101] "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell e Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [102] "Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols" (Volume 42 da série "Methods in Molecular Medicine"). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [103] Allison e Byars (1992) *Res. Immunol.* 143: 519-25.
- [104] Hariharan e cols. (1995) *Cancer Res.* 55: 3.486-9.
- [105] US-2007/014805.
- [106] WO 95/11700.
- [107] Patente U.S. 6.080.725.
- [108] WO 2006/113373.
- [109] WO 2005/097181.
- [110] GB-A-2220211.
- [111] US-5472706.
- [112] WO 2006/110603.
- [113] Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy". 20ª Edição, ISBN: 0683306472.
- [114] *RIVM report* 124001 004.
- [115] *RIVM report* 000012 003.
- [116] Bakke e cols. (2001) *Infect. Immun.* 69: 5.010-

5.015.

[117] WO 01/30390.

[118] <http://neisseria.org/mn/typing/mlst/>.

[119] Tettelin e cols. (2000) *Science* 287: 1.809-1.315.

[120] Pettersson e cols. (1994) *Microb. Pathog.* 17(6): 395-408.

[121] Welsch e cols. (2002) "Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health", Oslo, Noruega; 1-6 de setembro de 2002. "Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C *Neisseria meningitidis* strains".

[122] Santos e cols. (2002) "Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health", Oslo, Noruega; 1-6 de setembro de 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of *N. meningitidis*".

[123] WO 2007/000327.

[124] WO 2007/071707.

### REIVINDICAÇÕES

1. Kit, **caracterizado** pelo fato de que compreende: (i) um primeiro recipiente contendo um adjuvante que compreende uma emulsão óleo-em-água; e (ii) um segundo recipiente contendo uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

2. Kit, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a composição antigênica liofilizada no segundo recipiente ainda compreende um sacarídeo capsular conjugado de um ou mais dos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y de *N. meningitidis*.

3. Composição antigênica liofilizada, **caracterizada** pelo fato de que compreende: (i) um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*, e (ii) um sacarídeo capsular conjugado de um ou mais dos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y de *Neisseria meningitidis*.

4. Método para a preparação de uma composição imunogênica, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma etapa de mistura de: (i) um adjuvante que compreende uma emulsão óleo-em-água; e (ii) uma composição antigênica liofilizada que compreende um imunógeno para despertar uma resposta imunológica contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a composição antigênica liofilizada ainda compreende um sacarídeo capsular conjugado de um ou mais dos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y de *N. meningitidis*.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a composição antigênica liofilizada é como definida na reivindicação 3.

7. Kit, composição ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a composição antigênica liofilizada compreende vesículas da membrana de uma cepa do sorogrupo B de *N. meningitidis*.

8. Kit, composição ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que a composição antigênica liofilizada compreende proteínas recombinantes de uma cepa do sorogrupo B de *N. meningitidis*.

9. Kit, composição ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que a composição antigênica liofilizada compreende um lipo-oligossacarídeo de uma cepa do sorogrupo B de *N. meningitidis*.

FIGURA 1

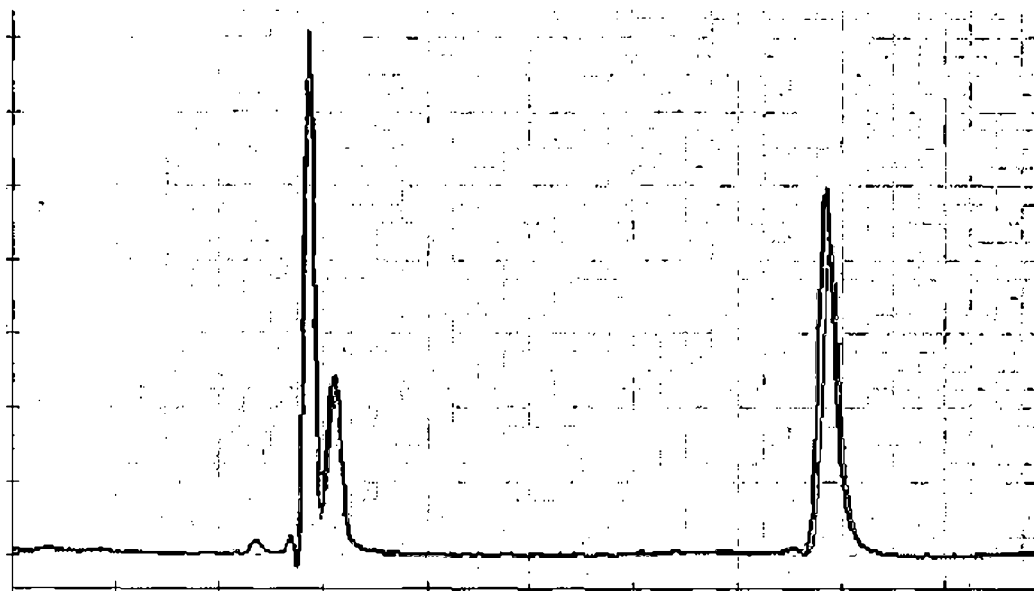


FIGURA 2

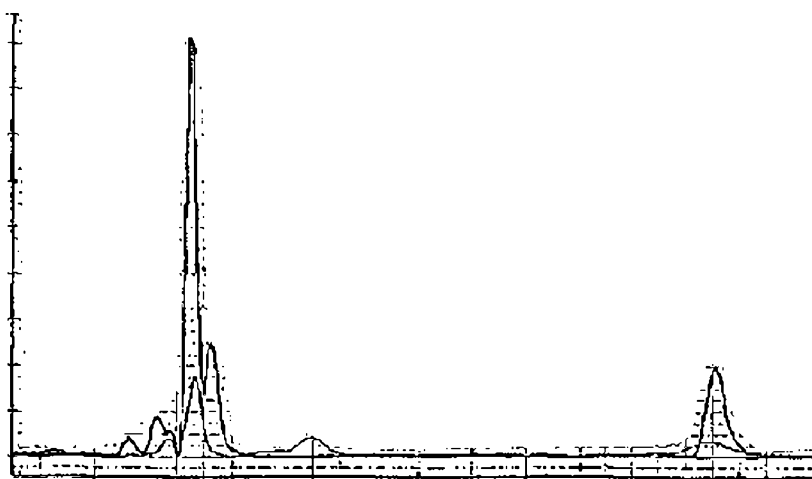
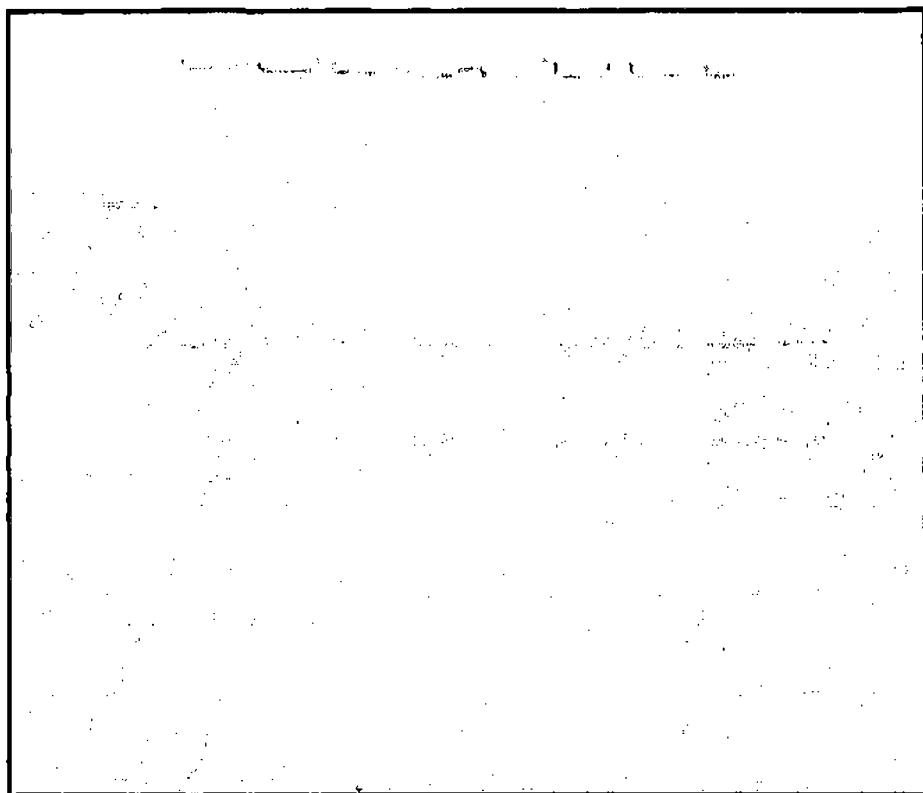


FIGURA 3



**RESUMO****KIT, COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA LIOFILIZADA E MÉTODO PARA  
PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA**

É fornecida uma formulação dupla para vacinas contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis* ("Men-B") que compreende: (i) um adjuvante de emulsão óleo-em-água e (ii) um componente imunogênico de Men-B em forma liofilizada. Os antígenos liofilizados de Men-B podem ser reconstituídos na forma líquida com adjuvante no momento de utilização, pronta para administração a um paciente. Verificou-se que essa formulação gera resultados excelentes em termos tanto de estabilidade quanto de imunogenicidade. O componente liofilizado também pode incluir um ou mais sacarídeos conjugados de *N. meningitidis* nos sorogrupos A, C, W135 e/ou Y.