

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

(22) Data de pedido: 2004.10.04	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L. VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA (SI)	IT
(30) Prioridade(s): 2003.10.02 GB 0323102 2004.05.28 GB 0412052	(72) Inventor(es): MARIO CONTORNI	IT
(43) Data de publicação do pedido: 2008.08.27	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	PT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.04.27 121/2011		

(54) Epígrafe: **VACINAS COMBINADAS CONTRA A MENINGITE**

(57) Resumo:

A ADIÇÃO DE UM CONJUGADO DE HIB A CONJUGADOS MENINGOCÓCICOS POTÊNCIA A ACTIVIDADE GLOBAL CONTRA O SEROGRUPO W135 DE MENINGOCOCOS.

RESUMO**"VACINAS COMBINADAS CONTRA A MENINGITE"**

A adição de um conjugado de Hib a conjugados meningocócicos potencia a actividade global contra o serogrupo W135 de meningococos.

DESCRIÇÃO

"VACINAS COMBINADAS CONTRA A MENINGITE"

Campo técnico

A presente invenção refere-se a imunização contra meningite bacteriana, e particularmente a imunização combinada contra meningite bacteriana produzida por múltiplos patogénios.

Técnica anterior

A *N. meningitidis* é um patogénio humano Gram-negativo não móvel que coloniza a faringe e causa meningite (e, ocasionalmente, septicemia em ausência de meningite). Causa tanto doença endémica como epidémica. Após a introdução da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib), a *N. meningitidis* é a principal causa de meningite bacteriana em E.U.A. Um terceiro patogénio responsável pela meningite bacteriana é *Streptococcus pneumoniae*, mas agora está disponível uma vacina eficaz (PrevNar™ [1]). Do mesmo modo que a vacina contra Hib, a vacina pneumocócica baseia-se em antigénios sacarídeos capsulares conjugados.

Com base no polissacárido capsular do organismo foram identificados diversos serogrupos de *N. meningitidis* que incluem (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y e Z). O serogrupo A é o patogénio quase sempre implicado na doença epidémica no África subsaariana. Os serogrupos B e C são responsáveis pela grande maioria dos casos nos Estados Unidos e na maioria dos países desenvolvidos. Os serogrupos W135 e Y são responsáveis pelo resto dos casos nos Estados Unidos e países desenvolvidos. Embora o polissacárido capsular seja um imunogénio protector eficaz, cada serogrupo requer um antigénio sacarídeo separado, e esta

solução não é adequada para imunizar contra o serogrupo B. Portanto, o sucesso recente com vacinas de sacáridos conjugados contra o serogrupo C (Menjugate™ [2], Meningitec™ e NeisVac-C™) não teve impacto sobre a doença produzida pelos serogrupos A, B, W135 ou Y; pelo contrário, apresentam uma pressão selectiva para a emergência destes serogrupos como causa principal de doença meningocócica.

Há muitos anos que se conhece uma vacina tetravalente injectável de polissacáridos capsulares dos serogrupos A, C, Y e W135 [3,4] e está autorizada para utilização em seres humanos. Os polissacáridos nesta vacina estão presentes sem estarem conjugados e numa relação de peso 1:1:1:1 [5] com 50 µg de cada polissacárido purificado. Embora seja eficaz em adolescentes e adultos, induz uma má resposta imune e curta duração da protecção e não pode ser utilizado em lactantes [por exemplo, ref. 6]. Além disso, as vacinas têm a desvantagem de requerer a reconstituição a partir de formas liofilizadas no momento de utilização.

Uma vacina demonstrou ser elusiva para o serogrupo B. Foram testadas vacinas com base em vesículas da membrana externa [por exemplo, ref. 7], mas a protecção está normalmente restringida à estirpe usada para preparar a vacina.

Portanto, continua a existir a necessidade de uma vacina que proteja contra os serogrupos A, C, W135 e Y meningocócicos em crianças, e também uma que não necessite de reconstituição antes da administração. Além disso, continua a existir a necessidade de uma vacina que proteja amplamente contra o serogrupo B.

O documento WO 02/00249 descreve uma composição de vacina multivalente, um conjugado do polissacárido capsular de *H. influenzae* de tipo b e dois ou mais polissacáridos bacterianos adicionais.

O documento WO 2004/067030 divulga uma composição imunogénica injectável que compreende sacáridos capsulares de pelo menos dois dos serogrupos A, C, W 135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Os sacáridos capsulares estão conjugados com proteína(s) transportadora(s) e/ou são oligossacáridos. na composição, (i) a composição compreende <50 µg de sacárido meningocócico por dose e/ou (ii) a composição compreende além disso um antigénio de um ou mais do (a) serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo b; e/ou (c) *Streptococcus pneumoniae*. Os antigénios sacarídeos nas composições estão geralmente conjugados com um veículo.

Divulgação da invenção

A invenção satisfaz todas estas diversas necessidades e baseia-se em oito descobertas separadas. Primeiro, os inventores descobriram que os sacáridos capsulares conjugados dos serogrupos C, W135 e Y meningocócicos são seguros e imunogénicos em seres humanos quando são combinados numa dose única. Segundo, descobriram que este efeito é retido quando é adicionado um sacárido capsular conjugado do serogrupo A. Terceiro, descobriram que estes antigénios conjugados podem ser combinados de maneira estável numa dose aquosa única sem a necessidade de liofilização. Quarto, descobriram que pode ser conseguida a ampla protecção contra infecção pelo serogrupo B utilizando um número pequeno de antigénios de polipéptidos definidos. Quinto, descobriram que estes antigénios de polipéptidos podem ser combinados com os antigénios sacarídeos sem perda da eficácia protectora para quaisquer dos cinco serogrupos. Sexto, descobriram que a eficácia é retida inclusive se é adicionado um conjugado de Hib. Sétimo, descobriram que a eficácia de um conjugado do serogrupo W135 é potenciada por

meio da adição de antigénios de proteínas derivados de uma estirpe do serogrupo B. Finalmente, descobriram que a adição de um conjugado de Hib a conjugados meningocócicos potencia a actividade global contra o serogrupo W135 de meningococo.

A invenção proporciona a composição imunogénica aquosa de quaisquer das reivindicações 1-6. A composição pode incluir adicionalmente antigénios sacarídeos capsulares conjugados dos serogrupos C e Y e, opcionalmente, A. Adicionalmente inclui antigénios de polipéptidos do serogrupo B de *N. meningitidis*.

Os antigénios sacarídeos preferidos são oligossacáridos.

Serogrupos C, W135 e Y

As técnicas para preparar polissacáridos capsulares a partir de meningococos conhecem-se desde há muitos anos e normalmente implicam um processo que compreende as etapas de precipitação de polissacáridos (por exemplo, utilizando um detergente catiónico), fraccionamento com etanol, extracção em fenol frio (para eliminar a proteína) e ultracentrifugação (para eliminar LPS) [por exemplo, veja-se a ref. 8].

Um processo [9] mais preferido implica a precipitação de polissacáridos seguido da solubilização do polissacárido precipitado utilizando um álcool de cadeia curta. A precipitação pode ser conseguida utilizando um detergente catiónico tal como sais de tetrabutílamónio e cetiltrimetilamónio (por exemplo, os sais de brometo), ou brometo de hexadimetrina e sais de miristiltrimetilamónio. O brometo de cetiltrimetilamónio ('CTAB') é particularmente preferido [10]. A solubilização do material precipitado pode ser conseguida utilizando um álcool de cadeia curta

tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dióis, etc., mas o etanol é particularmente adequado para solubilizar complexos de CTAB-polissacárido. O etanol pode ser adicionado ao polissacárido precipitado dando uma concentração de etanol final (com base no conteúdo total de etanol e água) de entre 50% e 95%.

Depois da ressolubilização, o polissacárido pode ser tratado adicionalmente para eliminar os contaminantes. Isto é particularmente importante em situações em que inclusive não é aceitável uma contaminação menor (por exemplo, para a produção de vacinas humanas). Isto implicará normalmente uma ou mais etapas de filtração, por exemplo, pode ser utilizada filtração profunda, filtração através de carbono activo, filtração por tamanho e/ou ultrafiltração.

Uma vez que foi filtrado para eliminar os contaminantes, o polissacárido pode ser precipitado para o tratamento e/ou processamento posteriores. Isto pode ser conseguido convenientemente permutando catiões (por exemplo, por meio da adição de sais de cálcio ou de sódio).

Depois da purificação, os sacáridos capsulares estão conjugados com proteínas portadoras como se descreve a seguir.

Outros métodos e métodos alternativos para a purificação e conjugação dos sacáridos meningocócicos são divulgados nas referências 11 e 12.

Como alternativa à purificação, os sacáridos capsulares da presente invenção podem ser obtidos por meio de síntese total ou parcial, por exemplo, a síntese de Hib é divulgada na ref. 13 e a síntese de MenA na ref. 14.

O sacárido pode estar quimicamente modificado, por exemplo, pode estar O-acetilado ou des-O-acetilado. Qualquer des-O-acetilação ou hiper-acetilação tal pode

estar em posições específicas no sacárido. Por exemplo, a maioria das estirpes do serogrupo C têm grupos O-acetilo na posição C-7 e/ou C-8 dos resíduos de ácido siálico, mas aproximadamente 15% das estirpes isoladas clínicas não possuem estes grupos O-acetilo [15,16]. A acetilação não parece que afecta a eficácia protectora (por exemplo, ao contrário do produto Menjugate™, o produto NeisVac-C™ utiliza um sacárido des-O-acetilado, mas ambas vacinas são eficazes). O sacárido do serogrupo W135 é um polímero de unidades de dissacáridos de ácido siálico-galactose. O sacárido do serogrupo Y é similar ao sacárido do serogrupo W135, excepto que a unidade de repetição de dissacáridos inclui glicose em lugar de galactose. Do mesmo modo que os sacáridos do serogrupo C, os sacáridos de MenW135 e MenY têm O-acetilação variável, mas nas posições 7 e 9 do ácido siálico [17]. Qualquer modificação química tal tem lugar preferentemente antes da conjugação, mas pode ocorrer alternativa ou adicionalmente durante a conjugação.

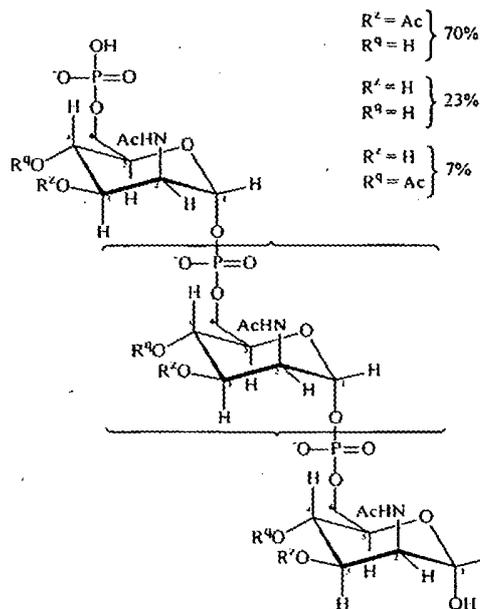
Os sacáridos de diferentes serogrupos são purificados preferentemente por separado, e então podem ser combinados, tanto antes como depois da conjugação.

Serogrupo A

As composições da invenção podem incluir um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo A. O sacárido pode ser purificado e conjugado da mesma forma que para os serogrupos C, W135 e Y (veja-se anteriormente), embora seja estruturalmente diferente - enquanto que as cápsulas dos serogrupos C, W 135 e Y baseiam-se em ácido siálico (ácido *N*-acetil-neuramínico, NeuAc), a cápsula do serogrupo A baseia-se em *N*-acetil-manosamina, que é o precursor natural do ácido siálico. O sacárido do serogrupo A é particularmente susceptível à hidrólise, e sua

instabilidade em meios aquosos significa que (a) a imunogenicidade de vacinas líquidas contra o serogrupo A diminui com o tempo, e (b) o controlo de qualidade é mais difícil devido à libertação de produtos da hidrólise de sacáridos na vacina.

O sacárido capsular de MenA nativo é um homopolímero de *N*-acetil-D-manosamina-1-fosfato ligado em (α 1-6) com *O*-acetilação parcial em C3 e C4. A principal ligação glicosídica é uma ligação fosfodiéster em 1-6 que implica o grupo hemiacetal de C1 e o grupo álcool de C6 da D-manosamina. O comprimento de cadeia médio é 93 monómeros. Tem a seguinte fórmula:



Os inventores prepararam um antigénio sacarídeo modificado que retêm a actividade imunogénica do sacárido do serogrupo A nativo, mas que é muito mais estável em água. Os grupos hidroxilo unidos nos carbonos 3 e 4 das unidades do monosacárido estão substituídas por um grupo de bloqueio [ref. 18].

Pode variar o número de unidades de monosacáridos que têm grupos de bloqueio em lugar de hidroxilos. Por exemplo,

todas ou substancialmente todas as unidades de monosacáridos podem ter grupos de bloqueio. Como alternativa, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das unidades de monosacáridos podem ter grupos de bloqueio. Pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 unidades de monosacáridos podem ter grupos de bloqueio.

Do mesmo modo, pode variar o número de grupos de bloqueio numa unidade de monosacáridos. Por exemplo, o número de grupos de bloqueio em qualquer unidade de monosacáridos particular pode ser 1 ou 2.

A unidade de monosacáridos terminal pode ou pode não ter um grupo de bloqueio em lugar de seu hidroxilo nativo. Prefere-se reter um grupo hidroxilo anomérico livre numa unidade de monosacáridos terminal com o propósito de proporcionar uma manipulação para outras reacções (por exemplo, conjugação). Os grupos hidroxilo anoméricos podem ser convertidos em grupos amino ($-NH_2$ ou $-NH-Y$ em que Y é um grupo protector de azoto) por meio de aaminação redutora (utilizando, por exemplo, $NaBH_3CN/NH_4Cl$), e então pode ser gerenerado depois de que outros grupos hidroxilo tenham se convertido em grupos de bloqueio.

Os grupos de bloqueio para substituir grupos hidroxilo podem estar directamente acessiveis por meio de uma reacção de derivatização do grupo hidroxilo, isto é, substituindo o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo por outro grupo. Derivados de grupos hidroxilo adequados que agem de grupos de bloqueio são, por exemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por exemplo, éteres silílicos ou éteres alquílicos) e acetais. Alguns exemplos específicos de tais grupos de bloqueio são alilo, Aloc, benzilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS,

TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Outros grupos de bloqueio que não estão directamente acessíveis e que substituem completamente o grupo hidroxilo incluem alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, NR¹R² (R¹ e R² são definidos no seguinte parágrafo), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃, CCl₃, etc.

Grupos de bloqueio preferidos são de fórmula: -O-X-Y ou -OR³ em que: X é C(O), S(O) ou SO₂; Y é alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ ou aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada um dos quais pode estar opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃; ou Y é NR¹R²; R¹ e R² são seleccionados independentemente de H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆; ou R¹ e R² podem se ligar para formar um grupo heterocíclico C₃₋₁₂ saturado; R³ é alquilo C₁₋₁₂ ou cicloalquilo C₃₋₁₂, cada um dos quais pode estar opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente seleccionados de F, Cl, Br, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃; ou R³ é arilo C₅₋₁₂ ou aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada um dos quais pode estar opcionalmente substituído com 1, 2, 3, 4 ou 5 grupos seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃. Se R³ é alquilo C₁₋₁₂ ou cicloalquilo C₃₋₁₂, normalmente está substituído com 1, 2 ou 3 grupos como são definidos anteriormente. Se R¹ e R² juntam-se para formar um grupo heterocíclico C₃₋₁₂ saturado significa que R¹ e R² junto com o átomo de azoto formam um grupo heterocíclico saturado que contém qualquer número de átomos de carbono entre 3 e 12 (por exemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). O grupo heterocíclico pode conter 1 ou 2 heteroátomos (tais como N, O ou S) distintos do átomo de azoto. Exemplos do grupo heterocíclico C₃₋₁₂ saturado são pirrolidinilo,

piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidínilo e aziridinilo.

Os grupos de bloqueio $-O-X-Y$ e $-OR^3$ podem ser preparados a partir de grupos $-OH$ por meio de procedimentos de derivatização padrão tais como reacção do grupo hidroxilo com um haleto de acilo, haleto de alquilo, haleto de sulfonilo, etc. *Portanto*, o átomo de oxigénio em $-O-X-Y$ é preferentemente o átomo de oxigénio do grupo hidroxilo, enquanto que o grupo $-X-Y$ em $-O-X-Y$ substitui preferentemente o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo. Como alternativa, os grupos de bloqueio podem estar acessíveis por meio de uma reacção de substituição tal como uma substituição de tipo Mitsunobu. Estes e outros métodos de preparação de grupos de bloqueio a partir de grupos hidroxilo são muito conhecidos.

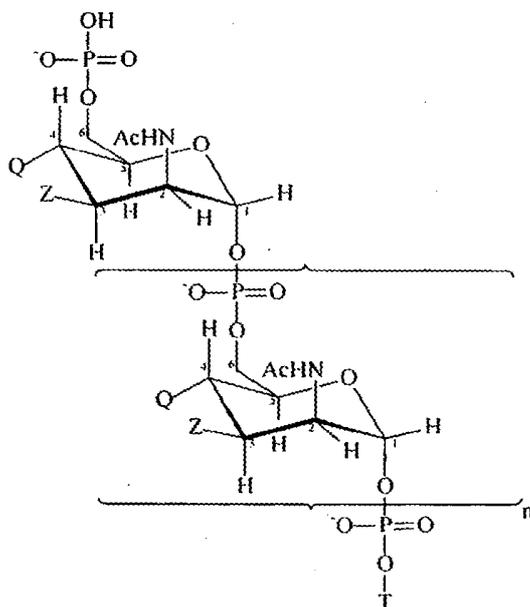
Mais preferentemente, o grupo de bloqueio é $-OC(O)CF_3$ [19], ou um grupo carbamato $-OC(O)NR^1R^2$ em que R^1 e R^2 são seleccionados independentemente de alquilo C_{1-6} . Mais preferentemente, R^1 e R^2 são ambos metilo, isto é, o grupo de bloqueio é $-OC(O)NMe_2$. Os grupos de bloqueio carbamato têm um efeito estabilizante sobre a ligação glicosídica e podem ser preparados sob condições suaves.

Os sacáridos de MenA modificados preferidos contêm n unidades de monosacáridos em que pelo menos o $h\%$ das unidades de monosacáridos não têm grupos $-OH$ nas duas posições 3 e 4. O valor de h é 24 ou mais (por exemplo, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 ou 100) e é preferentemente 50 ou mais. Os grupos $-OH$ ausentes são preferentemente grupos de bloqueio como são definidos anteriormente.

Outros sacáridos de MenA modificados preferidos compreendem unidades de monosacáridos em que pelo menos s das unidades de monosacáridos não têm $-OH$ na posição 3 e

não têm -OH na posição 4. O valor de s é pelo menos 1 (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90). Os grupos -OH ausentes são preferentemente grupos de bloqueio como são definidos anteriormente.

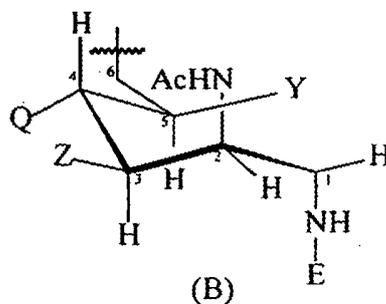
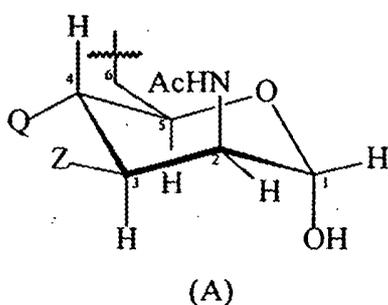
Os sacáridos de MenA modificados adequados para utilização com a invenção têm a fórmula:



em que

n é um número inteiro de 1 a 100 (preferentemente um número inteiro de 5 a 25, mais preferentemente 15-25);

T é de fórmula (A) ou (B):



cada grupo Z é seleccionado independentemente de OH ou um grupo de bloqueio como foi definido anteriormente; e

cada grupo Q é seleccionado independentemente de OH ou um grupo de bloqueio como foi definido anteriormente;

Y é seleccionado de OH ou um grupo de bloqueio como foi definido anteriormente;

Y é H ou um grupo protector de azoto;

e em que mais de aproximadamente 7% (por exemplo, 8%, 9%, 10% ou mais) dos grupos Q são grupos de bloqueio.

Cada um dos $n+2$ grupos Z podem ser iguais ou diferentes entre si. Do mesmo modo, cada um dos $n+2$ grupos Q podem ser iguais ou diferentes entre si. Todos os grupos Z podem ser OH. Como alternativa, pelo menos 10%, 20, 30%, 40%, 50% ou 60% dos grupos Z podem ser OAc. Preferentemente, aproximadamente 70% dos grupos Z são OAc, sendo o resto dos grupos Z grupos OH ou de bloqueio como foi definido anteriormente. Pelo menos aproximadamente 7% dos grupos Q são grupos de bloqueio. Preferentemente, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou inclusive 100% dos grupos Q são grupos de bloqueio.

Grupos de bloqueio preferidos são grupos aceitadores de electrões. Sem desejar estar limitado pela teoria, acredita-se que as ligações glicosídicas são instáveis à hidrólise devido à ajuda de um ataque nucleófilo intramolecular de um grupo hidroxilo de sacárido na ligação glicosídica (isto é, por meio da formação de um produto intermediário cíclico). Quanto maior seja a nucleofilia do grupo hidroxilo maior será a tendência ao ataque nucleófilo intramolecular. Um grupo de bloqueio aceitador de electrões tem o efeito de deslocar o par de iões oxigénio, diminuindo assim a nucleofilia do oxigénio e aumentando a tendência ao ataque nucleófilo intramolecular.

Portanto, para proteger contra o serogrupo A, as composições aquosas podem incluir um sacárido modificado de MenA como foi definido anteriormente.

As composições preferidas da invenção podem ser armazenadas durante 28 dias a 37°C e, depois desse período, menos do $f\%$ da quantidade total inicial de sacárido de MenA conjugado estará sem conjugar, sendo f 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 ou menos.

Conjugação covalente

Os sacáridos capsulares em composições da invenção serão conjugados normalmente com proteína(s) portadora(s). Em geral, a conjugação potencia a imunogenicidade de sacáridos a medida que os converte de antigénios independentes de T em antigénios dependentes de T, permitindo assim a iniciação de memória imunológica. A conjugação é particularmente útil para vacinas pediátricas e é uma técnica muito conhecida [por exemplo, revisada nas refs. 20 a 29].

As proteínas portadoras preferidas são toxinas ou toxóides bacterianos tais como o toxóide diftérico ou o toxóide tetânico, ou o mutante da toxina diftérica CRM₁₉₇ [30-32]. Outras proteínas portadoras adequadas incluem a proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [33], péptidos sintéticos [34,35], proteínas de choque térmico [36,37], proteínas de pertussis [38,39], citocinas [40], linfocinas [40], hormonas [40], factores de crescimento [40], proteínas artificiais que compreendem epítomos de linfócitos T CD4⁺ humanos múltiplos de diversos antigénios derivados de patogénios [41] tais como a proteína N19 [42], a proteína D de *H. influenzae* [43,44], pneumolisina [45], proteína PspA da superfície pneumocócica [46], proteínas de captação de ferro [47], toxina A ou B de *C. difficile* [48],

toxinas bacterianas mutantes (por exemplo, toxina do cólera 'CT' ou toxina lábil ao calor de *E. coli* 'LT') tais como uma CT com uma substituição em Glu-29 [49], etc., os veículos preferidos são o toxóide diftérico, o toxóide tetânico, a proteína D de *H. influenzae* e particularmente CRM₁₉₇.

Dentro de uma composição da invenção é possível utilizar mais de uma proteína transportadora, por exemplo, para reduzir o risco da supressão de veículo. Portanto, podem ser utilizado diferentes proteínas portadoras para diferentes serogrupos, por exemplo, os sacáridos do serogrupo A poderiam ser conjugados com CRM₁₉₇, enquanto que os sacáridos do serogrupo C poderiam ser conjugados com toxóide tetânico. Também é possível utilizar mais de uma proteína transportadora para um antigénio sacarídeo particular, por exemplo, os sacáridos do serogrupo A poderiam estar em dois grupos, com alguns conjugados com CRM₁₉₇ e outros conjugados com toxóide o tetânico. No entanto, em geral prefere-se utilizar a mesma proteína transportadora para todos os serogrupos, sendo CRM₁₉₇ a escolha preferida.

Uma única proteína transportadora poderia levar mais de um antigénio sacarídeo [50]. Por exemplo, uma única proteína transportadora poderia ter sido conjugado com sacáridos dos serogrupos A e C. Para conseguir este objectivo, os sacáridos podem ser misturados antes da reacção de conjugação. No entanto, em geral prefere-se ter conjugados separados para cada serogrupo.

Preferem-se conjugados com uma relação de sacárido:proteína (peso/peso) de entre 1:5 (isto é, proteína em excesso) e 5:1 (isto é, sacárido em excesso). Preferem-se relações entre 1:2 e 5:1 já que as relações entre 1:1,25 e 1:2,5 são mais preferidas. Pode ser

preferido a proteína transportadora em excesso para MenA e MenC.

Os conjugados podem ser utilizados conjuntamente com proteína transportadora livre [51]. Quando uma proteína transportadora dada está presente em forma tanto livre como conjugada numa composição da invenção, a forma sem conjugar é preferentemente não mais de 5% da quantidade total da proteína transportadora na composição como um todo, e mais preferentemente está presente a menos do 2% em peso.

Pode ser utilizado qualquer reacção de conjugação adequada, com qualquer *linker* adequado se for necessário.

O sacárido será activado ou funcionalizado normalmente antes da conjugação. A activação pode implicar, por exemplo, reagentes de cianilação tais como CDAP (por exemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio [52, 53, etc.]). Outras técnicas adequadas utilizam carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norbornano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; veja-se também a introdução à referência 27).

As ligações por meio de um grupo *linker* podem ser feitas utilizando qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos descritos nas referências 54 e 55. Um tipo de ligação envolve a aminação redutora do polissacárido, acoplamento do grupo amino resultante com uma extremidade de um grupo de ligação de ácido adípico e em seguida acoplamento de uma proteína à outra extremidade do grupo de ligação de ácido adípico [25, 56, 57]. Outros *linkers* incluem B-propionamido [58], nitrofenil-etilamina [59], haleto de haloacilos [60], ligações glicosídicas [61], ácido 6-aminocapróico [62], ADH [63], fracções C₄ a C₁₂ [64], etc. Como alternativa à utilização de um *linker* pode ser utilizada a ligação directa. As ligações directas

à proteína podem compreender a oxidação do polissacárido seguido da aaminação redutora com a proteína, como é descrito em, por exemplo, as referências 65 e 66.

Prefere-se um processo que envolve a introdução de grupos amino no sacárido (por exemplo, substituindo grupos =O terminais com -NH₂) seguido de derivatização com um diéster adípico (por exemplo, N-hidroxisuccinimidodiéster de ácido adípico) e reacção com proteína transportadora. Outra reacção preferida utiliza a activação de CDAP com um veículo de proteína D, por exemplo, para MenA ou MenC.

Depois da conjugação os sacáridos livres podem ser separados e conjugados. Existem muitos métodos adequados que incluem cromatografia hidrófoba, ultrafiltração tangencial, diafiltração, etc. [vejam-se também as refs. 67 e 68, etc.].

Se a composição da invenção inclui um oligossacárido conjugado, prefere-se que a preparação do oligossacárido preceda à conjugação.

Depois da conjugação, os métodos da invenção podem incluir uma etapa de medir o nível de proteína transportadora sem conjugar. Uma forma de fazer esta medição envolve electroforese capilar [69] (por exemplo, em solução livre), ou cromatografia electrocinética micelar [70].

Depois da conjugação, os métodos da invenção podem incluir uma etapa de medir o nível de sacárido sem conjugar. Uma forma de fazer esta medição implica HPAEC-PAD [67].

Depois da conjugação, os métodos da invenção podem incluir uma etapa de separar o sacárido conjugado do sacárido sem conjugar. Uma forma de separar estes sacáridos é utilizar um método que precipite selectivamente um componente. Prefere-se a precipitação selectiva de sacárido

conjugado para deixar sacárido sem conjugar em solução, por exemplo, por meio de um tratamento com desoxicolato [67].

Depois da conjugação, os métodos da invenção podem incluir uma etapa de medir o tamanho molecular e/ou a massa molar de um conjugado. Em particular podem ser medidas distribuições. Uma forma de fazer estas medições envolve cromatografia de exclusão por tamanho com detecção por fotometria de dispersão da luz multiângulo e refractometria diferencial (SEQ-MALS/RI) [71].

Oligossacáridos

Os sacáridos capsulares serão utilizados geralmente em forma de oligossacáridos. Estes se formam convenientemente por fragmentação de polissacárido capsular purificado (por exemplo, por meio de hidrólise), que normalmente irá seguido de purificação dos fragmentos do tamanho desejado.

A fragmentação de polissacáridos é realizada preferentemente dando um grau de polimerização (GP) médio final no oligossacárido de menos de 30 (por exemplo, entre 10 e 20, preferentemente aproximadamente 10 para o serogrupo A; entre 15 e 25 para os serogrupos W 135 e Y, preferentemente aproximadamente 15-20; entre 12 e 22 para o serogrupo C; etc.). O GP pode ser medido convenientemente por cromatografia de permuta iónica ou por ensaios colorimétricos [72].

Se é realizada a hidrólise, o hidrolisado será dimensionado geralmente a fim de eliminar oligossacáridos de comprimento curto [73]. Isto pode ser conseguido de diversas formas tais como ultrafiltração seguida de cromatografia de permuta iónica. Os oligossacáridos com um grau de polimerização inferior a ou igual a aproximadamente 6 são eliminados preferentemente para o serogrupo A, e

aqueles de menos de aproximadamente 4 são eliminados preferentemente para os serogrupos W 135 e E.

A hidrólise química de sacáridos implica geralmente tratamento com tanto ácido como base em condições que são padrão na técnica. As condições para a despolimerização de sacáridos capsulares em seus monosacáridos constituintes conhecem-se na técnica. Um método de despolimerização envolve a utilização de peróxido de hidrogénio [11]. O peróxido de hidrogénio é adicionado a um sacárido (por exemplo, dando uma concentração de H₂O₂ final de 1%), e em seguida a mistura é incubada (por exemplo, a aproximadamente 55°C) até que tenha sido alcançada uma redução de comprimento de cadeia desejada. A redução com o tempo pode ir seguida da retirada de amostras da mistura e em seguida da medição do tamanho molecular (médio) do sacárido na amostra. A despolimerização pode em seguida ser detida por meio de arrefecimento rápido uma vez se tenha alcançado um comprimento de cadeia desejado.

Serogrupo B

As vacinas contra patogénios tais como o vírus da hepatite B, a difteria e o tétano normalmente contêm um único antigénio de proteína (por exemplo, o antigénio de superfície do VHB ou um toxóide tetânico). Ao contrário, a vacinas contra a tosse convulsa acelular normalmente contêm pelo menos três proteínas de *B. pertusis* e a vacina pneumocócica PreVNar™ contêm sete antigénios sacarídeos conjugados separados. Outras vacinas tais como as vacinas de pertusis celular, a vacina contra o sarampo, a vacina contra a poliomielite inactivada (IPV) e as vacinas OMV meningocócicas são por sua própria natureza misturas complexas de um grande número de antigénios. Tanto se a protecção pode ser provocada ou não por um único antigénio,

um número pequeno de antigénios definidos, ou uma mistura complexa de antigénios sem definir, depende, portanto, do patogénio em questão.

Como é mencionado anteriormente, uma vacina contra o meningococo do serogrupo B demonstrou ser evasiva. As vacinas com base em OMV mostram uma estreita eficácia. Além disso, o grande número de antigénios sem definir presentes numa OMV, combinado com sua natureza variável, significa que as OMV têm diversos problemas de controlo de qualidade. Os inventores encontraram que pode ser conseguida a ampla protecção contra a infecção pelo serogrupo B, e que isto pode ser conseguido utilizando um número pequeno de antigénios de polipéptidos do serogrupo B definidos e, portanto, as composições da invenção incluem um ou mais antigénios de polipéptidos de forma que a composição possa induzir uma resposta imune que é bactericida contra dois ou mais (isto é, 2 ou 3) das linhagens hipervirulentas A4, ET-5 e a linhagem 3 do serogrupo B de *N. meningitidis*.

Sequências do genoma para serogrupos A [74] e B [75,76] meningocócicos têm sido reportadas e podem se seleccionados antigénios adequados dos polipéptidos codificados [por exemplo, refs. 77-82]. Os antigénios candidatos foram manipulados para melhorar a expressão heteróloga [refs. 83 a 85].

Uma composição preferida inclui uma proteína Tbp e uma proteína Hsf [86]. Hsf é uma proteína autotransportadora [87-89] também conhecida como nhhA [89], GNA0992 [77] ou NMB0992 [75]. Tbp é uma proteína de ligação a transferrina [90-93] e engloba tanto TbpA como TbpB e as formas de alto peso molecular e sob peso molecular de TbpA e TbpB. Tbp engloba as proteínas individuais descritas anteriormente e complexos das proteínas e qualquer outra proteína ou complexo da mesma que possa se ligar a transferrina. Embora

a Tbp possa referir-se tanto às formas de alto como de baixo peso molecular de TbpA ou TbpB, prefere-se que estejam presentes ambas as formas de alto peso molecular e baixo peso molecular de TbpA e/ou TbpB. O mais preferentemente está presente TbpA de alto peso molecular e de baixo peso molecular.

Outra composição preferida inclui o lipooligossacárido do serogrupo B (LOS) [94]. O LOS pode ser utilizado além do(s) polipéptido(s) do serogrupo B ou pode ser utilizado em lugar de ele(s).

Outra composição preferida inclui pelo menos um antigénio seleccionado de cada uma das pelo menos duas categorias diferentes de proteínas que têm diferentes funções dentro de *Neisseria*. Exemplos de tais categorias de proteínas são: adesinas, proteínas autotransportadoras, toxinas, proteínas de membrana externa integrais e proteínas de aquisição de ferro. Estes antigénios podem ser seleccionados do seguinte modo utilizando a nomenclatura da referência 95: pelo menos uma adesina de *Neisseria* seleccionada do grupo que consiste em FhaB, NspA PiIC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119 e NadA; pelo menos um autotransportador de *Neisseria* seleccionado do grupo que consiste em Hsf, Hap, protease IgA, AspAy NadA; pelo menos uma toxina de *Neisseria* seleccionada do grupo que consiste em FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT (NMB 1343) e um ou ambos de LPS imunotipo L2 e LPS imunotipo L3; pelo menos uma proteína de aquisição de Fe de *Neisseria* seleccionada do grupo que consiste em TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, Lipo28 (GNA2132), Sibp, NMB0964, NMB0293, FbpA, Bcp, BfrA, BfrB e P2086 (XthA); pelo menos uma proteína associada à membrana de *Neisseria*, preferentemente proteína de membrana externa, particularmente proteína de membrana externa integral,

selecionada do grupo que consiste em PilQ, OMP85, FhaC, NspA, TbpA, LbpA, TspA, TspB, TdfH, PorB, MitA, HpuB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA (GNA1946), NMB1124, NMB 1162, NMB1220, NMB1313, NMB 1953, HtrA e PLDA (OMPLA). Diz-se que estas combinações de antigénios de *Neisseria* levam a um surpreendente potenciamento da eficácia da vacina contra infecção por *Neisseria* [95]. Composições particularmente preferidas incluem um ou mais dos cinco seguintes antigénios [96]: (1) uma proteína 'NadA', preferentemente em forma oligomérica (por exemplo, em forma trimérica); (2) uma proteína '741'; (3) uma proteína '936'; (4) uma proteína '953'; e (5) uma proteína '287'.

'NadA' (adesina A de *Neisseria*) de MenB é divulgada como a proteína '961' na referência 80 (SEQ ID 2943 e 2944) e como 'NMB1994' na referência 75 (vejam-se também os números de acesso de GenBank: 11352904 e 7227256). Um estudo detalhado da proteína pode ser encontrado na referência 97. Se é utilizada de acordo com a presente invenção, NadA pode tomar diversas formas. As formas preferidas de NadA são variantes de truncação ou de deleção tais como as divulgadas nas referências 83 a 85. Em particular, NadA prefere-se sem sua âncora de membrana da extremidade C (por exemplo, deleção de resíduos 351-405 para a estirpe 2996 dando SEQ ID NO:1 no presente documento), que algumas vezes se distingue no presente documento pela utilização de um sobrescrito 'C', por exemplo, NadA^(C). A expressão de NadA sem seu domínio de âncora de membrana em *E. coli* produz a secreção da proteína no sobrenadante de cultura com eliminação concomitante de seu péptido líder 23mero (por exemplo, para deixar um 327mero para a estirpe 2996 [SEQ ID N°:2 no presente documento]). Os polipéptidos sem seus péptidos líderes se distinguem algumas vezes no presente documento pela

utilização de um sobrescrito 'NL', por exemplo, NadA^(NL) ou NadA^(C)(^{NL}). Os polipéptidos NadA preferidos têm uma sequência de aminoácidos que: (a) tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais) com a SEQ ID N°:2; e/ou (b) compreendem um fragmento de pelo menos n aminoácidos consecutivos de SEQ ID N°:1, 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). Os fragmentos preferidos para (b) não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) da extremidade C e/ou da extremidade N de SEQ ID N°:1 (por exemplo, NadA^(C), NadA^(NL), NadA^(C)(^{NL})). Outros fragmentos preferidos compreendem um epítipo de SEQ ID 1, e um fragmento particularmente preferido de SEQ ID 1 é SEQ ID 2. Estas diversas sequências inclui variantes de NadA (por exemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Mostram-se diversas sequências de NadA na Figura 9 da referência 98.

A proteína '741' de MenB é divulgada na referência 80 (SEQ ID 2535 e 2536) e como 'NMB1870' na referência 75 (veja-se também o número de acesso de GenBank G1:7227128). A proteína correspondente no serogrupo A [74] tem um número de acesso de GenBank 7379322. 741 é naturalmente uma lipoproteína. Se é utilizada de acordo com a presente invenção, a proteína 741 pode tomar diversas formas. Formas preferidas de 741 são variantes de truncação ou de deleção tais como as divulgadas nas referências 83 a 85. Em particular, a extremidade N de 741 pode ser deletada até e incluir sua sequência de poli-glicina (isto é, deleção de resíduos 1 a 72 para a estirpe MC58 [SEQ ID N°:3 no presente documento]), que se distingue algumas vezes no presente documento pela utilização de um prefixo 'ΔG'. Esta

deleção pode potencializar a expressão. A deleção também elimina o lugar de lipidação de 741. As sequências de 741 preferidas têm uma sequência de aminoácidos que: (a) tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais) com SEQ ID N°:3; e/ou (b) compreende um fragmento de pelo menos n aminoácidos consecutivos de SEQ ID N°:3 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). Os fragmentos preferidos para (b) compreendem um epítipo de 741. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) da extremidade C e/ou da extremidade N de SEQ ID N°:3. Estas sequências incluem 741 variantes (por exemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Podem ser encontradas diversas sequências de 741 em SEQ ID 1 a 22 da referência 85, em SEQ ID 1 a 23 da referência 99 e em SEQ ID 1-299 da referência 100.

A proteína '936' do serogrupo B é divulgada na referência 80 (SEQ ID 2883 e 2884) e como 'NMB2091' na referência 75 (veja-se também o número de acesso de GenBank GI:7227353). O gene correspondente no serogrupo A [74] tem o número de acesso de GenBank 7379093. Se é utilizada de acordo com a presente invenção, a proteína 936 pode tomar diversas formas. As formas preferidas de 936 são variantes de truncação ou de deleção tais como as divulgadas nas referências 83 a 85. Em particular, o péptido líder da extremidade N de 936 pode estar deletado (por exemplo, deleção dos resíduos 1 a 23 para a estirpe MC58 dando 936^(NL) [SEQ ID N°:4 no presente documento]). As sequências de 936 preferidas têm uma sequência de aminoácidos que: (a) tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais) com SEQ ID N°:4; e/ou (b) compreende

um fragmento de pelo menos n aminoácidos consecutivos de SEQ ID N°:4 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). Os fragmentos preferidos para (b) compreendem um epítipo de 936. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) da extremidade C e/ou da extremidade N de SEQ ID N°:4. Estas sequências incluem variantes de 936 (por exemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.).

A proteína '953' do serogrupo B é divulgada na referência 80 (SEQ ID 2917 e 2918) e como 'NMB1030' na referência 75 (veja-se também o número de acesso de GenBank GI:7226269). A proteína correspondente no serogrupo A [74] tem o número de acesso de GenBank 7380108. Se é utilizada de acordo com a presente invenção, a proteína 953 pode tomar diversas formas. Formas preferidas de 953 são variantes de truncação ou de deleção tais como as divulgadas nas referências 83 a 85. Em particular, o péptido líder da extremidade N de 953 pode estar deletado (por exemplo, deleção dos resíduos 1 a 19 para a estirpe MC58 dando 953^(NL) [SEQ ID N°:5 no presente documento]. As sequências de 953 preferidas têm uma sequência de aminoácidos que: (a) tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais) com SEQ ID N°:5; e/ou (b) compreende um fragmento de pelo menos n aminoácidos consecutivos de SEQ ID N°:5 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). Os fragmentos preferidos para (b) compreendem um epítipo de 953. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) da extremidade C e/ou da

extremidade N de SEQ ID N°:5. Estas sequências incluem variantes de 936 (por exemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). As formas alélicas de 953 podem verse na Figura 19 da referência 82.

A proteína '287' do serogrupo B é divulgada na referência 80 (SEQ ID 3103 e 3104), como 'NMB2132' na referência 75 e como 'GNA2132' na referência 77 (veja-se também o número de acesso de GenBank GI:7227388). A proteína correspondente no serogrupo A [74] tem o número de acesso de GenBank 7379057. Se é utilizada de acordo com a presente invenção, a proteína 287 pode tomar diversas formas. Formas preferidas de 287 são variantes de truncação ou de deleção tais como as divulgadas nas referências 83 a 85. Em particular, a extremidade N de 287 pode ser deletada até e incluir sua sequência de poli-glicina (por exemplo, deleção de resíduos 1 a 24 para a estirpe MC58 dando Δ G287 [SEQ ID N°:6 no presente documento]). Esta deleção pode potenciar a expressão. As sequências de 287 preferidas têm uma sequência de aminoácidos que: (a) tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais) com SEQ ID N°:6; e/ou (b) compreende um fragmento de pelo menos n aminoácidos consecutivos de SEQ ID N°:6 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). Os fragmentos preferidos para (b) compreendem um epítipo de 287. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) da extremidade C e/ou da extremidade N de SEQ ID N°:6. Estas sequências incluem 287 variantes (por exemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). As formas alélicas de 287 podem verse nas Figuras 5 e 15 da referência 82, e

no Exemplo 13 e a Figura 21 da referência 80 (SEQ ID 3179 a 3184).

Os antigénios de MenB preferidos compreendem uma sequência de aminoácidos encontrada numa das estirpes 2996, MC58, 95N477 e 394/98. A proteína 287 é preferentemente da estirpe 2996, ou mais preferentemente da estirpe 394/98. A proteína 741 é preferentemente das estirpes MC58, 2996, 394/98 ou 95N477 do serogrupo B, ou da estirpe 90/18311 do serogrupo C. A estirpe MC58 é mais preferida. As proteínas 936, 953 e NadA são preferentemente da estirpe 2996. Se uma composição inclui um antigénio de proteína particular (por exemplo, 741 ou 287), a composição pode incluir esse antigénio em mais de uma forma variante, por exemplo, a mesma proteína, mas de mais de uma estirpe. Estas proteínas podem ser incluídas como proteínas em tándem ou separadas.

No entanto, em algumas formas de realização, a composição da invenção inclui a mesma proteína, mas de mais de uma estirpe. Foi encontrado que esta solução é eficaz com a proteína 741. Esta proteína é um antigénio extremamente eficaz para provocar respostas de anticorpos antimeningocócicos e é expressa através de todos os serogrupos meningocócicos. A análise filogenética mostra que a proteína se divide em dois grupos, e que um destes se divide de novo dando três variantes em total [101] e, enquanto que o soro produzido contra uma variante dada é bactericida dentro do mesmo grupo de variante, não é activo contra estirpes que expressam uma das outras duas variantes, isto é, existe protecção cruzada intra-variante, mas não protecção cruzada inter-variante [99, 101]. Portanto, para a máxima eficácia de estirpes cruzadas prefere-se que uma composição inclua mais de uma variante de proteína 741. Uma sequência por meio de exemplo de cada variante é proporcionada em SEQ ID N°: 10, 11 e 12 no

presente documento, começando com um resíduo de cisteína da extremidade N à qual o lípido se ligará covalentemente na forma de lipoproteína nativa. Portanto, prefere-se que a composição possa incluir pelo menos dois de: (1) uma primeira proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos $a\%$ de identidade de sequências com SEQ ID N°:10 e/ou que compreende uma sequência de aminoácidos que consiste num fragmento de pelo menos x aminoácidos contíguos de SEQ ID N°:10; (2) uma segunda proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que têm pelo menos $b\%$ de identidade de sequências com SEQ ID N°: 11 e/ou que compreende uma sequência de aminoácidos que consiste num fragmento de pelo menos e aminoácidos contíguos de SEQ ID N°:11; e (3) uma terceira proteína, que compreende uma sequência de aminoácidos que têm pelo menos $c\%$ de identidade de sequências com SEQ ID N°:12 e/ou que compreende uma sequência de aminoácidos que consiste num fragmento de pelo menos z aminoácidos contíguos de SEQ ID N°:12. O valor de a é pelo menos 85, por exemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 ou mais. O valor de b é pelo menos 85, por exemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 ou mais. O valor de c é pelo menos 85, por exemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 ou mais. Os valores de a , b e c não estão intrinsecamente relacionados entre si. O valor de x é 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 e é 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 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 , e e z não estão intrinsecamente relacionados entre si. Prefere-se que qualquer sequência de aminoácidos de 741 dada não esteja em mais de uma das categorias (1), (2) e (3). Portanto, qualquer sequência de 741 dada estará em somente uma das categorias (1), (2) e (3). Portanto, prefere-se que: a proteína (1) tenha menos de $i\%$ de identidade de sequências com a proteína (2); a proteína (1) tenha menos de $j\%$ de identidade de sequências com a proteína (3); e a proteína (2) tenha menos de $k\%$ de identidade de sequências com a proteína (3). O valor de i é 60 ou mais (por exemplo, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) e no máximo é a . O valor de j é 60 ou mais (por exemplo, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) e no máximo é b . O valor de k é 60 ou mais (por exemplo, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) e no máximo é c . Os valores de i , j e k não estão intrinsecamente relacionados entre si.

A composição da invenção incluem um pequeno número (por exemplo, inferior a t antigénios, sendo t 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ou 3) de antigénios do serogrupo B purificados. É particularmente preferido que a composição não possa incluir misturas complexas ou sem definir de antigénios, por exemplo, prefere-se que na composição não se incluam vesículas da membrana externa. Os antigénios são expressos preferentemente de maneira recombinante num hospedeiro heterólogo e em seguida são purificados. Para uma

composição que inclui t antigénios de MenB podem ser t polipéptidos separados mas, para reduzir inclusive mais a complexidade, prefere-se que pelo menos dois dos antigénios sejam expressos como uma única cadeia de polipéptidos (uma proteína 'híbrida' [refs. 83 a 85]), isto é, de forma que os t antigénios formem menos de t polipéptidos. As proteínas híbridas oferecem duas vantagens principais: primeiro, uma proteína que pode ser instável ou ser mal expressa por si mesma pode ser ajudada adicionando um componente híbrido adequado que vença o problema; segundo, o fabrico comercial se simplifica já que somente necessita ser empregada uma expressão e purificação a fim de produzir duas proteínas separadamente úteis. Uma proteína híbrida incluída numa composição da invenção pode compreender dois ou mais (isto é, 2, 3, 4 ou 5) dos cinco antigénios enumerados anteriormente. Preferem-se híbridos que consistem em dois dos cinco antigénios.

Dentro da combinação de cinco antigénios básicos (NadA, 741, 953, 936 e 287), um antigénio pode estar presente em mais de uma proteína híbrida e/ou como uma proteína não híbrida. No entanto, prefere-se que um antigénio esteja presente tanto como um híbrido como um não híbrido, mas não como ambos, embora possa ser útil incluir a proteína 741 tanto como um antigénio híbrido como um não híbrido (preferentemente lipoproteína), particularmente quando é utilizada mais de uma variante de 741.

As proteínas híbridas podem ser representadas pela fórmula **NH₂-A-[-X-L-]_n-B-COOH** em que: X é uma sequência de aminoácidos de um dos cinco antigénios básicos; L é uma sequência de aminoácidos *linker* opcional; A é uma sequência de aminoácidos da extremidade N opcional; B é uma sequência de aminoácidos da extremidade C opcional; e n é 2, 3, 4 ou 5.

O mais preferentemente, n é 2. Híbridos de dois antigénios para utilização na invenção compreendem: NadA e 741; NadA e 936; NadA e 953; NadA e 287; 741 e 936; 741 e 953; 741 e 287; 936 e 953; 936 e 287; 953 e 287. Duas proteínas preferidas são: X_1 é 936 e X_2 é 741; X_1 é 287 e X_2 é 953.

Se um resíduo -X- tem uma sequência de péptidos líder em sua forma natural, esta pode ser incluída ou omitida na proteína híbrida. Em algumas formas de realização, os péptidos líderes estarão deletados, excepto o do resíduo -X- localizado na extremidade N da proteína híbrida, isto é, se conservará o péptido líder de X_1 , mas serão omitidos os péptidos líderes de $X_2 \dots X_n$. Isto é equivalente a deletar todos os péptidos líderes e utilizar o péptido líder de X_1 como resíduo -A-.

Para cada caso de n de [-X-L-], a sequência *linker* de aminoácidos -L- pode estar presente ou ausente. Por exemplo, se $n = 2$ o híbrido pode ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, etc. A(s) sequência(s) de aminoácidos *linker*(s) -L- serão normalmente curtas (por exemplo, 20 ou menos aminoácidos, isto é, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos compreendem sequências de péptidos curtas que facilitam a clonagem, *linkers* de poli-glicina (isto é, que compreendem Gly_n em que $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais) e caudas de histidina (isto é, His_n em que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais). Outras sequências de aminoácidos *linkers* adequadas serão evidentes para aqueles peritos na especialidade. Um *linker* útil é GSGGGG (SEQ ID 9), estando o dipéptido Gly-Ser formado por um lugar de restrição *Bam*HI, ajudando assim na clonagem e a manipulação, e sendo o tetrapéptido $(\text{Gly})_4$ um *linker* de poli-glicina típico. Se X_{n+1} é uma proteína ΔG e L_n é um

linker de glicina, isto pode ser equivalente a X_{n+1} não estando uma proteína ΔG e estando ausente L_n .

-A- é uma sequência de aminoácidos da extremidade N opcional. Esta será normalmente curta (por exemplo, 40 ou menos aminoácidos, isto é, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem sequências líderes para dirigir o tráfego de proteínas, ou sequências de péptidos curtas que facilitam a clonagem ou purificação (por exemplo, caudas de histidina, isto é, His_n em que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais). Outras sequências de aminoácidos da extremidade N adequadas serão evidentes para aqueles peritos na especialidade. Se X_1 não possui sua própria metionina da extremidade N, -A- é preferentemente um oligopéptido (por exemplo, com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 aminoácidos) que proporciona uma metionina da extremidade N.

-B- é uma sequência de aminoácidos da extremidade C opcional. Esta será normalmente curta (por exemplo, 40 ou menos aminoácidos, isto é, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem sequências para dirigir o tráfego de proteínas, sequências de péptidos curtas que facilitam a clonagem ou purificação (por exemplo, que compreendem caudas de histidina, isto é, His_n em que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais) ou sequências que potenciam a estabilidade de proteínas. Outras sequências de aminoácidos da extremidade C adequadas serão evidentes para aqueles peritos na especialidade.

Duas proteínas híbridas particularmente preferidas da invenção são do seguinte modo:

n	A	X₁	L₁	X₂	L₂	B	SEQ ID Nº:
2	MA	ΔG287	GSGGGG	953 ^(NL)	-	-	7
2	M	936 ^(NL)	GSGGGG	ΔG741	-	-	8

Estas duas proteínas podem ser utilizadas em combinação com NadA (particularmente com SEQ ID N°:2). Portanto, uma composição preferida de antigénios de MenB para utilização com a invenção inclui um primeiro polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID N°:2, um segundo polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID N°:7 e um terceiro polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID N°:8. Este é um grupo preferido de antigénios de MenB para utilização com a invenção.

Como foi mencionado anteriormente, as composições da invenção podem induzir uma resposta de anticorpos bactericidas do soro que é eficaz contra duas ou três das linhagens hipervirulentas de MenB A4, ET-5 e a linhagem 3. Adicionalmente podem induzir respostas de anticorpos bactericidas contra uma ou mais das linhagens hipervirulentas do subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 ou complexo ET-37, e contra outras linhagens, por exemplo, linhagens hiperinvasivas. Estas respostas de anticorpos são medidas convenientemente em ratinhos e são um indicador padrão da eficácia de vacinas [por exemplo, veja-se a nota final 14 da referência 77]. A actividade bactericida do soro (SBA) mede a destruição bactericida mediada por complemento e pode ser ensaiadas utilizando complemento humano ou de bebé de coelho. Os padrões da OMS requerem uma vacina para induzir pelo menos um aumento de 4 vezes em SBA em mais do 90% dos receptores.

A composição não necessita induzir anticorpos bactericidas contra todas as estirpes de MenB dentro destas linhagens hipervirulentas; ao invés disso, para qualquer grupo dado de quatro ou mais estirpes de meningococo do serogrupo B dentro de uma linhagem hipervirulenta particular, os anticorpos induzidos pela composição são bactericidas contra pelo menos 50% (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais) do grupo. Os grupos preferidos de estirpes incluirão estirpes isoladas em pelo menos quatro dos seguintes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR e CU. O soro tem preferentemente um 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 superior, preferentemente pelo menos 2^{14}) isto é, o soro pode destruir pelo menos 50% das bactérias de teste de uma estirpe particular quando é diluído 1/1024, como é descrito na referência 77.

As composições preferidas podem induzir respostas bactericidas contra as seguintes estirpes de meningococo do serogrupo B: (i) do conjunto A4, a estirpe 961-5945 (B:2b:P 1,21,16) e/ou a estirpe G2136 (B:-); (ii) do complexo ET-5, a estirpe MC58 (B:15:PI.7,16b) e/ou a estirpe 44/76 (B:15:P 1,7,16); (iii) do linhagem 3, a estirpe 394/98 (B:4:P 1,4) e/ou a estirpe BZ198 (B:NT:-). Composições mais preferidas podem induzir respostas bactericidas contra as estirpes 961-5945, 44/76 e 394/98. As estirpes 961-5945 e G2136 são ambas estirpes de referência por MLST de *Neisseria* [identificações 638 e 1002 na ref. 102]. A estirpe MC58 está amplamente disponível (por exemplo, ATCC BAA-335) e foi a estirpe sequenciada na referência 75. A estirpe 44/76 foi utilizada e caracterizada amplamente (por exemplo, a ref. 103) e é uma das estirpes de referência por MLST de *Neisseria* [identificação 237 na ref. 102; fila 32 do Quadro 2 na ref. 104]. A estirpe 394/98 foi isolada

originariamente em Nova Zelândia em 1998 e houveram diversos estudos utilizando esta estirpe (por exemplo, refs. 105 e 106). A estirpe BZ198 é outra estirpe de referência por MLST [identificação 409 na ref. 102; fila 41 do Quadro 2 na ref. 104]. A composição pode induzir adicionalmente uma resposta bactericida contra a estirpe LNP17592 do serogrupo W135 (W135:2a:P 1,5,2) do complexo ET-37. Esta é uma estirpe Haji isolada na França em 2000.

Outros antigénios de polipéptidos de MenB que podem ser incluídos nas composições da invenção incluem aqueles que compreendem uma das seguintes sequências de aminoácidos: SEQ ID N°:650 da ref. 78; SEQ ID N°:878 da ref. 78; SEQ ID N°:884 da ref. 78; SEQ ID N°:4 da ref. 79; SEQ ID N°:598 da ref. 80; SEQ ID N°:818 da ref. 80; SEQ ID N°:864 da ref. 80; SEQ ID N°:866 da ref. 80; SEQ ID N°:1196 da ref. 80; SEQ ID N°:1272 da ref. 80; SEQ ID N°:1274 da ref. 80; SEQ ID N°:1640 da ref. 80; SEQ ID N°:1788 da ref. 80; SEQ ID N°:2288 da ref. 80; SEQ ID N°:2466 da ref. 80; SEQ ID N°:2554 da ref. 80; SEQ ID N°:2576 da ref. 80; SEQ ID N°:2606 da ref. 80; SEQ ID N°:2608 da ref. 80; SEQ ID N°:2616 da ref. 80; SEQ ID N°:2668 da ref. 80; SEQ ID N°:2780 da ref. 80; SEQ ID N°:2932 da ref. 80; SEQ ID N°:2958 da ref. 80; SEQ ID N°:2970 da ref. 80; SEQ ID N°:2988 da ref. 80, ou um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos que: (a) tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais) com as ditas sequências; e/ou (b) compreende um fragmento de pelo menos *n* aminoácidos consecutivos das ditas 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). Os fragmentos preferidos para (b) compreendem um epítipo da sequência relevante. Pode ser

incluído mais de um (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou mais) destes polipéptidos.

Componentes antigénicos adicionais

Os antigénios não meningocócicos e de não *Neisseria*, preferentemente aqueles que não diminuem a resposta imune contra os componentes meningocócicos, também podem ser incluídos em composições da invenção. A ref. 107, por exemplo, divulga combinações de oligossacáridos dos serogrupos B e C de *N. meningitidis* junto com o sacárido Hib. Antigénios não meningocócicos particularmente preferidos incluem:

- um antigénio da difteria tal como um toxóide diftérico [por exemplo, capítulo 3 da ref. 108].
- um antigénio do tétanos tal como um toxóide tetânico [por exemplo, capítulo 4 da ref. 108].
- holotoxina de Pertussis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou os aglutinógenos 2 e 3 [por exemplo, refs. 109 e 110].
- antigénio celular de pertussis.
- um antigénio do vírus da hepatite A tal como vírus inactivado [por exemplo, 111, 112].
- um antigénio do vírus da hepatite B tal como antigénios de superfície e/ou de núcleo [por exemplo, 112,113], estando o antigénio de superfície preferentemente adsorvido sobre um fosfato de alumínio [114].
- antigénio(s) da poliomielite [por exemplo, 115, 116] tal como IPV.

A mistura pode compreender um ou mais destes outros antigénios que podem estar desintoxicados se for necessário

(por exemplo, desintoxicação da toxina de pertusis por meios químicos e/ou genéticos).

Se um antigénio da difteria está incluído na mistura também prefere-se incluir antigénio do tétano e antigénios de pertussis. Similarmente, se um antigénio do tétano está incluído também prefere-se incluir antigénios da difteria e de pertussis. Similarmente, se um antigénio de pertusis está incluído também prefere-se incluir antigénios da difteria e do tétano.

Os antigénios na mistura estarão normalmente presentes a uma concentração de pelo menos 1 µg/ml cada um. Em geral, a concentração de qualquer antigénio dado será suficiente para provocar uma resposta imune contra esse antigénio. Prefere-se que a eficácia protectora dos antigénios sacarídeos individuais não se elimine pela combinação dos mesmos, embora a imunogenicidade real possa ser reduzida (por exemplo, titulações de ELISA).

Como uma alternativa à utilização de antigénios de proteínas na mistura pode ser utilizado o ácido nucleico que codifica o antigénio. Portanto, os componentes de proteína da mistura podem ser substituídos por ácido nucleico (preferentemente ADN, por exemplo, em forma de um plasmídeo) que codifica a proteína. Similarmente, as composições da invenção podem compreender proteínas que imitam a os antigénios sacarídeos, por exemplo, mimótopes [117] ou anticorpos anti-idiotípicos. Estes podem substituir componentes de sacáridos individuais ou podem complementá-los. Como exemplo, a vacina pode compreender um mimético de péptido do polissacárido capsular de MenC [118] ou MenA [119] em lugar do próprio sacárido.

Um antigénio não meningocócico que se inclui em composições da invenção é um que protege contra *H. influenzae* de tipo b (Hib). Um antigénio não meningocócico

preferido para a inclusão adicional em composições da invenção é um que protege contra *Streptococcus pneumoniae*.

H. influenzae de tipo b (Hib)

A composição inclui um antigénio de *H. influenzae* de tipo b, especificamente um antigénio sacarídeo capsular de Hib conjugado. Os antigénios sacarídeos de *H. influenzae* b são muito conhecidos.

Vantajosamente, o sacárido de Hib está covalentemente conjugado com uma proteína transportadora a fim de potenciar sua imunogenicidade, especialmente em crianças. A preparação de conjugados de polissacárido em geral, e do polissacárido capsular de Hib em particular, está muito bem documentada [por exemplo, as referências 21-29, etc.]. A invenção pode utilizar qualquer conjugado de Hib adequado. Proteínas portadoras adequadas foram descritas anteriormente, e os veículos preferidos para sacáridos de Hib são CRM₁₉₇ ('HbOC'), toxóide tetânico ('PRP-T') e o complexo de membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

O resíduo de sacárido do conjugado pode ser um polissacárido (por exemplo, fosfato de polirribosilribitol de comprimento completo (PRP)), mas prefere-se hidrolisar polissacáridos para formar oligossacáridos (por exemplo, MW de -1 a -5 kDa).

Um conjugado preferido compreende um oligossacárido de Hib ligado covalentemente a CRM₁₉₇ por meio de um *linker* de ácido adípico [120, 121]. O toxóide tetânico também é um veículo preferido.

A administração do antigénio de Hib produz preferentemente uma concentração de anticorpo anti-PRP de $\geq 0,15$ $\mu\text{g/ml}$, e mais preferentemente ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$.

Com o antigénio sacarídeo de Hib na composição prefere-se não incluir um adjuvante de hidróxido de alumínio. Se a composição inclui um adjuvante de fosfato de alumínio, então o antigénio de Hib pode ser adsorvido ao adjuvante [122] ou pode ser não adsorvido [123]. A prevenção da adsorção pode ser conseguida seleccionando o pH correcto durante a mistura de antigénio/adjuvante, um adjuvante com um ponto apropriado de carga zero e uma ordem apropriada de mistura para os diversos antigénios diferentes numa composição [124].

As composições da invenção podem compreender mais de um antigénio de Hib. Os antigénios de Hib podem ser liofilizados, por exemplo, para reconstituição por composições meningocócicas da invenção.

Streptococcus pneumoniae

Se a composição inclui um antigénio de *S. pneumoniae*, normalmente será um antigénio sacarídeo capsular que está preferentemente conjugado com uma proteína transportadora [por exemplo, refs. 125 a 127]. Prefere-se incluir sacáridos de mais de um sorotipo de *S. pneumoniae*. Por exemplo, misturas de polissacáridos de 23 sorotipos diferentes são utilizadas amplamente já que são vacinas conjugadas com polissacáridos de entre 5 e 11 sorotipos diferentes [128]. Por exemplo, PrevNar™ [I] contém antigénios de sete sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), estando cada sacárido individualmente conjugado com CRM₁₉₇ por aminação redutora, com 2 µg de cada sacárido por 0,5 ml de dose (4 µg de sorotipo 6B), e com conjugados adsorvidos sobre um adjuvante de fosfato de alumínio. As composições da invenção incluem preferentemente pelo menos os sorotipos 6B, 14, 19F e 23F. Os conjugados podem ser adsorvidos sobre um fosfato de alumínio.

Como uma alternativa ao utilização de antigénios sacarídeos de pneumococos, a composição pode incluir um ou mais antigénios de polipéptidos. As sequências do genoma para várias estirpes de pneumococos estão disponíveis [129, 130] e podem ser submetidas a vacunologia inversa [131-134] para identificar antigénios de polipéptidos adequados [135, 136]. Por exemplo, a composição pode incluir um ou mais dos seguintes antigénios: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 e Sp130, como foi definido na referência 137. A composição pode incluir mais de um (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14) destes antigénios.

Em algumas formas de realização, a composição pode incluir tanto antigénios sacarídeos como de polipéptidos de pneumococos. Estes podem ser utilizados em mistura simples, ou o antigénio sacarídeo pneumocócico pode ser conjugado com uma proteína pneumocócica. Proteínas portadoras adequadas para tais formas de realização incluem os antigénios enumerados no parágrafo anterior [137].

Os antigénios pneumocócicos podem ser liofilizados, por exemplo, junto com antigénio de Hib.

Composições farmacêuticas

A composição da invenção compreenderá normalmente, além dos componentes mencionados anteriormente, um ou mais 'veículos farmacêuticamente aceitáveis' que incluem qualquer veículo que por si mesmo não induz a produção de anticorpos nocivos para o indivíduo que recebe a composição. Veículos adequados são normalmente macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarose [138], trehalose [139], lactose e

agregados de lípidos (tais como gotinhas de óleo ou lipossomas). Tais veículos são muito conhecidos para aqueles peritos na especialidade. As vacinas também podem conter diluentes tais como água, solução salina, glicerina, etc. Adicionalmente podem estar presentes substâncias auxiliares tais como agentes humectantes ou emulsionantes, substâncias de tamponamento de pH e similares. A solução salina fisiológica tamponada com fosfato estéril livre de pirogénios é um veículo típico. Uma discussão meticulosa de excipientes farmacologicamente aceitáveis está disponível na referência 140.

As composições da invenção estão em forma aquosa, isto é, soluções ou suspensões. A formulação líquida deste tipo permite que as composições sejam administradas directamente a partir de sua forma embalada sem a necessidade de reconstituição num meio aquoso e são, portanto, ideais para injeção. As composições podem ser apresentadas em frascos, ou podem ser apresentadas em seringas já carregadas. As seringas podem ser administradas com ou sem agulhas. Uma seringa incluirá uma dose única da composição, enquanto que um frasco pode incluir uma dose única ou dose múltiplas.

As composições líquidas da invenção também são adequadas para reconstituir outras vacinas de uma forma liofilizada, para reconstituir antigénios de Hib ou DTP liofilizados. Se uma composição da invenção é para ser utilizada para tal reconstituição extemporânea, a invenção proporciona um kit que pode compreender dois frascos, ou pode compreender uma seringa já carregada e um frasco, o conteúdo da seringa sendo utilizado para reactivar o conteúdo do frasco antes da injeção.

As composições da invenção podem embaladas em forma de dose unitária ou em forma de dose múltiplas. Para formas de doses múltiplas preferem-se os frascos a as seringas

previamente carregadas. Podem ser estabelecidos de forma rotineira volumes de dosagem eficazes, mas uma dose humana típica da composição para injeção tem um volume de 0,5 ml.

O pH da composição está preferentemente entre 6 e 8, preferentemente aproximadamente 7. O pH estável pode ser mantido por meio da utilização de um tampão. Se uma composição compreende um sal de hidróxido de alumínio, prefere-se utilizar um tampão de histidina [141]. A composição pode ser estéril e/ou livre de pirogénios. As composições da invenção podem ser isotónicas com respeito aos seres humanos.

As composições da invenção são imunogénicas e são mais preferentemente composições de vacina. As vacinas de acordo com a invenção podem ser tanto profilácticas (isto é, para evitar a infecção) como terapêuticas (isto é, para tratar a infecção), mas normalmente serão profilácticas. As composições imunogénicas utilizadas como vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de antigénio(s), além de qualquer outro componente, conforme seja necessário. Por 'quantidade imunologicamente eficaz' se indica que a administração dessa quantidade a um indivíduo, tanto numa dose única como parte de uma série, é eficaz para o tratamento ou a prevenção. Esta quantidade varia dependendo da saúde e a condição física do indivíduo que a ser tratado, idade, o grupo taxonómico do indivíduo que a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata, etc.), a capacidade do sistema imunitário do indivíduo para sintetizar anticorpos, o grau de protecção desejado, a formulação da vacina, a avaliação do médico clínico da situação médica e outros factores relevantes. Espera-se que a quantidade esteja num intervalo relativamente largo que possa ser determinado por ensaios rotineiros.

Dentro de cada dose, a quantidade de um antigénio sacarídeo individual estará geralmente entre 1-50 μg (medido como uma massa de sacárido), por exemplo, aproximadamente 1 μg , aproximadamente 2,5 μg , aproximadamente 4 μg , aproximadamente 5 μg ou aproximadamente 10 μg .

Cada sacárido pode estar presente a substancialmente a mesma quantidade por dose. No entanto, a relação (peso/peso) de sacárido de MenY:sacárido de MenW135 pode ser superior a 1 (por exemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou superior) e/ou a relação (peso/peso) de sacárido de MenY:sacárido de MenC pode ser inferior a 1 (por exemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, ou inferior).

Relações preferidas (peso/peso) para sacáridos dos serogrupos A:C:W135:Y são: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; e 2:2:2:1. Relações preferidas (peso/peso) para sacáridos dos serogrupos C:W135:Y são: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1; e 2:1:1. Prefere-se utilizar uma massa substancialmente igual de cada sacárido.

Composições preferidas da invenção compreendem menos de 50 μg de sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem ≤ 40 μg de sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem ≤ 30 μg de sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem ≤ 25 μg de sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem ≤ 20 μg de sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem ≤ 10 μg de sacárido meningocócico por dose mas, idealmente, as composições da invenção compreendem pelo menos 10 μg de sacárido meningocócico total por dose.

As composições da invenção podem incluir um agente antimicrobiano, particularmente quando é embalado em forma de doses múltiplas.

As composições da invenção podem compreender detergente, por exemplo, um Tween (polissorbato) tal como Tween 80. Os detergentes estão geralmente presentes a baixos níveis, por exemplo, <0,01%.

As composições da invenção podem incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio) para dar tonicidade. É típica uma concentração de 10 ± 2 mg/ml de NaCl.

As composições da invenção incluirão geralmente um tampão. É típico tampão fosfato.

As composições da invenção serão administradas geralmente conjuntamente com outros agentes imunorreguladores. Em particular, as composições incluirão normalmente um ou mais adjuvantes. Tais adjuvantes incluem, mas não se limitam a:

A. Composições que contêm minerais

As composições que contêm minerais adequadas para utilização como adjuvantes na invenção incluem sais minerais tais como sais de alumínio e sais de cálcio. A invenção inclui sais minerais tais como hidróxidos (por exemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por exemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por exemplo, vejam-se os capítulos 8 e 9 da ref. 142], ou misturas de diferentes compostos minerais, tomando os compostos qualquer forma adequada (por exemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), e sendo preferido com adsorção. As composições que contêm minerais também podem ser formuladas como uma partícula de sal metálica [143].

B. Emulsões de óleo

As composições de emulsão de óleo adequadas para utilização como adjuvantes na invenção incluem emulsões de esqualeno-água tais como MF59 [Capítulo 10 da ref. 142; veja-se também a ref. 144] (esqualeno a 5%, Tween 80 a 0,5% e Span 85 a 0,5%, formulado em partículas submicrométricas utilizando um microfluidizador). Também pode ser utilizado adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante incompleto de Freund (IFA).

C. Formulações de saponina [capítulo 22 da ref. 142]

As formulações de saponina também podem ser utilizadas como adjuvantes na invenção. As saponinas são um grupo heterólogo de glicósidos de esterol e triterpenóides que encontram-se na casca, folhas, caules, raízes e inclusive as flores de uma ampla gama de espécies vegetais. A saponina da casca do árvore *Quillaja saponaria* Molina foram estudadas exaustivamente como adjuvantes. A saponina também pode ser obtida comercialmente a partir de *Smilax ornata* (salsaparrilha), *Gypsophila paniculata* (véu de noiva) e *Saponaria officinalis* (raiz de sabão). As formulações de adjuvante de saponina incluem formulações purificadas tais como QS21, além disso de formulações de lípidos tais como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

As composições de saponina foram purificadas utilizando HPLC e RP-HPLC. Foram identificados frações purificadas específicas utilizando estas técnicas que incluem QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. Preferentemente, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é divulgada na ref. 145. As formulações de saponina também podem compreender um esterol, tal como colesterol [146].

As combinações de saponinas e colesteróis podem ser utilizadas para formar partículas únicas chamadas complexos

imunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 da ref. 142]. Os ISCOM também incluem normalmente um fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Pode ser utilizada qualquer saponina conhecida nos ISCOM. Preferentemente, o ISCOM inclui um ou mais de QuilA, QHA e QHC. Os ISCOM são descritas adicionalmente nas refs. 146-148. Opcionalmente, os ISCOM podem não possuir de detergente adicional [149].

Uma revisão do desenvolvimento de adjuvantes com base em saponinas pode ser encontradas nas refs. 150 e 151.

D. Virossomas e partículas similares a vírus

Os virossomas e as partículas similares a vírus (VLP) também podem ser utilizados como adjuvantes na invenção. Estas estruturas contêm geralmente uma ou mais proteínas de um vírus opcionalmente combinado ou formulado com um fosfolípido. São geralmente não patogénicas, não replicantes e geralmente não contêm nenhum dos genomas virais nativos. As proteínas virais podem ser produzidas de maneira recombinante ou ser isoladas a partir de vírus completos. Estas proteínas virais adequadas para utilização em virossomas ou VLP incluem proteínas derivadas do vírus da gripe (tal como HA ou NA), vírus da hepatite B (tal como proteínas de núcleo ou de cápside), vírus da hepatite Y, vírus do sarampo, vírus Sindbis, rotavírus, vírus da febre aftosa, retrovírus, vírus de Norwalk, vírus do papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas da revestimento), fago GA, fago fr, fago AP205 e Ty (tal como a proteína p1 do retrotransposição Ty). Os VLP são discutidos adicionalmente nas refs. 152-157. Os virossomas são discutidos adicionalmente em, por exemplo, a ref. 158.

E. Derivados bacterianos ou microbianos

Os adjuvantes adequados para utilização na invenção incluem derivados bacterianos ou microbiano tais como derivados não tóxicos de lipopolissacárido enterobacteriano (LPS), derivados do lípido A, oligonucleótidos imunoestimuladores e toxinas ribosilantes de ADP e derivados desintoxicados das mesmas.

Os derivados não tóxicos de LPS incluem monofosforil lípido A (MPL) e MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL é uma mistura de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Uma forma de "partícula pequena" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado é divulgada na ref. 159. Tais "partículas pequenas" de 3dMPL são suficientemente pequenas para ser esterilizadas por filtração através de uma membrana de 0,22 µm [159]. Outros derivados de LPS não tóxicos incluem miméticos de monofosforil lípido A tais como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por exemplo, RC-529 [160, 161].

Os derivados do lípido A incluem derivados do lípido A de *Escherichia coli* tais como OM-174. OM-174 é descrito, por exemplo, nas refs. 162 e 163.

Os oligonucleótidos imunoestimuladores adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem sequências de nucleótidos que contêm um motivo CpG (uma sequência de dinucleótidos que contém uma citosina sem metilar ligada por uma ligação fosfato a uma guanossina). Também foi mostrado que os ARN de cadeia dupla e os oligonucleótidos que contêm sequências palindrômicas ou de poli(dG) são imunoestimuladores.

Os CpG podem incluir modificações/análogos de nucleótidos tais como modificações de fosforotioato e podem ser de cadeia dupla ou de cadeia simples. As referências 164, 165 e 166 divulgam possíveis substituições análogas, por exemplo, substituição de guanossina com 2'-desoxi-7-

deazaguanosina. O efeito adjuvante de oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente nas refs. 167-172.

A sequência de CpG pode ser dirigida a TLR9, tal como o motivo GTCGTT ou TTCGTT [173]. A sequência de CpG pode ser específica para induzir uma resposta imune Th1 tal como um ODN CpG-A, ou pode ser mais específica para induzir uma resposta de linfócitos B tal como ODN CpG-B. Os ODN CpG-A e CpG-B são tratadas nas refs. 174-176. Preferentemente, o CpG é o ODN CpG-A.

Preferentemente, o oligonucleótido de CpG é construído de maneira que a extremidade 5' esteja acessível para o reconhecimento de receptores. Opcionalmente, duas sequências de oligonucleótidos de CpG podem se ligar em suas extremidades 3' para formar "imunómeros". Vejam-se, por exemplo, as refs. 173 e 177-179.

As toxinas ribosilantes de ADP bacterianas e os derivados desintoxicados das mesmas podem ser utilizados como adjuvantes na invenção. Preferentemente, a proteína é derivada de *E. coli* (enterotoxina lábil ao calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") ou Pertusis ("PT"). a utilização de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adjuvantes da mucosa é descrito na ref. 180 e como adjuvantes parentéricos na ref. 181. A toxina ou o toxóide estão preferentemente em forma de uma holotoxina que compreende tanto subunidades A como B. Preferentemente, a subunidade A contém uma mutação desintoxicante; preferentemente a subunidade B não está mutada. Preferentemente, o adjuvante é um mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 e LT-G192. A utilização de toxinas ribosilantes de ADP e derivados desintoxicados das mesmas, particularmente LT-K63 e LT-R72, como adjuvantes pode ser encontrada nas refs. 182-189. A referência numérica para substituições de aminoácidos baseia-se preferentemente nos alinhamentos das

subunidades A e B de toxinas ribosilantes de ADP expostas na ref. 190.

F. Imunomoduladores humanos

Os imunomoduladores humanos adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem citocinas tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [191], etc.) [192], interferões (por exemplo, interferão γ), factor estimulante de colónias de macrófagos, factor de necrose tumoral.

G. Bioadesivos e mucoadesivos

Também podem ser utilizado bioadesivos e mucoadesivos como adjuvantes na invenção. Bioadesivos adequados incluem microesferas de ácido hialurónico esterificadas [193] ou mucoadesivos tais como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(álcool vinílico), polivinilpirrolidona, polissacáridos e carboximetilcelulose. Também podem ser utilizado quitosano e derivados do mesmo como adjuvantes na invenção [194].

H. Micropartículas

As micropartículas também podem ser utilizadas como adjuvantes na invenção. Preferem-se micropartículas (isto é, uma partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diâmetro, mais preferentemente ~200 nm a ~30 μ m de diâmetro, e o mais preferentemente ~500 nm a ~10 μ m de diâmetro) formadas a partir de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (por exemplo, um poli(α -hidroxiácido), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, etc.), com poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para ter uma superfície negativamente carregada (por exemplo, com SDS) ou uma

superfície positivamente carregada (por exemplo, com um detergente catiónico tal como CTAB).

I. Lipossomas (capítulos 13 e 14 da ref. 142)

Exemplos de formulações de lipossomas adequadas para utilização como adjuvantes são descritas nas refs. 195-197.

J. Formulações de polioxietilenéteres e polioxietilenésteres

Os adjuvantes adequados para utilização na invenção incluem polioxietilenéteres e polioxietilenésteres [198]. Tais formulações incluem adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano em combinação com um octoxinol [199], além disso de tensioactivos de polioxietilentalquiléter ou éster em combinação com pelo menos um tensioactivo não iónico adicional tal como um octoxinol [200]. Os polioxietilenéteres preferidos são seleccionados do seguinte grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter e polioxietilen-23-lauriléter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

As formulações de PCPP são descritas, por exemplo, nas refs. 201 e 202.

L. Muramilpéptidos

Exemplos de muramilpéptidos adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) e N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

M. Compostos de imidazoquinolona

Exemplos de compostos de imidazoquinolona adequados para utilização como adjuvantes na invenção incluem imiquimod e seus homólogos (por exemplo, "Resiquimod 3M"), descrito adicionalmente nas refs. 203 e 204.

A invenção também pode compreender combinações de aspectos de um ou mais dos adjuvantes identificados anteriormente. Por exemplo, as seguintes composições de adjuvante podem ser utilizadas na invenção: (1) uma saponina e uma emulsão de óleo em água [205]; (2) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado de LPS não tóxico (por exemplo, 3dMPL) [206]; (3) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado de LPS não tóxico (por exemplo, 3dMPL) + um colesterol; (4) uma saponina (por exemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um esteroide) [207]; (5) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões de óleo em água [208]; (6) SAF, que contém esqualeno a 10%, Tween 80™ a 0,4%, polímero de bloco de Pluronic a 5% L121 e thr-MDP, tanto microfluidizado numa emulsão submicrométrica como agitado com vórtex para gerar uma emulsão de maior tamanho de partícula; (7) sistema de adjuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contém esqualeno a 2%, Tween 80 a 0,2% e um ou mais componentes da parede celular bacteriana do grupo que consiste em monofosforil lípido A (MPL), trehalose dimicolato (TDM) e esqueleto de parede celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (8) um ou mais sais minerais (tais como um sal de alumínio) + um derivado de LPS não tóxico (tal como 3dMPL).

Outras substâncias que agem de agentes imunoestimulantes são divulgados no capítulo 7 da ref. 142.

Prefere-se particularmente a utilização de adjuvantes de sais de alumínio, e os antigénios são adsorvidos geralmente a tais sais. Os conjugados de MenC Menjugate™ e NeisVac™ utilizam um adjuvante de hidróxido, enquanto que Meningitec™ utiliza um fosfato. Em composições da invenção é possível adsorver alguns antigénios a um hidróxido de alumínio mas para ter outros antigénios em associação com um fosfato de alumínio. No entanto, em geral, somente prefere-se utilizar um único sal, por exemplo, um hidróxido ou um fosfato, mas não ambos. O hidróxido de alumínio se evita preferentemente como adjuvante, particularmente se a composição inclui um antigénio de Hib. Portanto, preferem-se composições que não contêm hidróxido de alumínio. Ao invés disso podem ser utilizados fosfatos de alumínio,, e um adjuvante típico é hidroxifosfato de alumínio amorfo com a relação molar de PO₄/Ao entre 0,84 e 0,92, incluído a 0,6 mg de Al³⁺/ml. Pode ser utilizado a adsorção com uma baixa dose de fosfato de alumínio, por exemplo, entre 50 e 100 µg de Al³⁺ por conjugado por dose. Se é utilizado um fosfato de alumínio e se deseja que não seja adsorvido um antigénio ao adjuvante, isto é favorecido incluindo iões fosfato livres em solução (por exemplo, utilizando um tampão fosfato).

Nem todos os conjugados necessitam ser adsorvidos, isto é, alguns ou todos podem estar livres em solução.

O fosfato de cálcio é outro adjuvante preferido.

Métodos de tratamento

Uma composição da invenção pode ser para produzir uma resposta de anticorpos num mamífero administrando uma composição farmacêutica da invenção ao mamífero.

A composição pode ser para utilização num método para produzir uma resposta imune num mamífero que compreende a etapa de administrar uma quantidade eficaz da composição da invenção. A resposta imune é preferentemente protectora e preferentemente envolve anticorpos. O método pode produzir uma resposta de reforço.

O mamífero é preferentemente um ser humano. Se a vacina é para utilização profiláctica, o ser humano é preferentemente uma criança (por exemplo, uma criança pequena ou lactante) ou um adolescente; se a vacina é para utilização terapêutica, o ser humano é preferentemente um adulto. Uma vacina prevista para crianças também pode ser administrada a adultos, por exemplo, para avaliar a segurança, dosagem, imunogenicidade, etc.

A invenção também proporciona uma composição da invenção para utilização como medicamento. O medicamento pode produzir preferentemente uma resposta imune num mamífero (isto é, é uma composição imunogénica) e é mais preferentemente uma vacina.

A invenção também proporciona a utilização de uma composição da invenção na preparação de um medicamento para produzir uma resposta imune num mamífero.

Estas utilizações e métodos são preferentemente para a prevenção e/ou o tratamento de uma doença produzida por uma *Neisseria* (por exemplo, meningite, septicemia, bacteremia, gonorreia, etc.). Prefere-se a prevenção e/ou o tratamento de meningite bacteriana e/ou meningocócica.

Uma forma de comprovar a eficácia do tratamento terapêutico implica monitorizar a infecção por *Neisseria* depois da administração da composição da invenção. Uma forma de comprovar a eficácia do tratamento profiláctico envolve monitorizar respostas imunes contra os cinco antigénios básicos depois da administração da composição. A

imunogenicidade de composições da invenção pode ser determinada administrando-as para testar indivíduos (por exemplo, crianças de 12-16 meses de idade, ou modelos animais [209]) e em seguida determinando parâmetros padrão que incluem anticorpos bactericidas do soro (SBA) e titulações de ELISA (GMT) de IgG anti-cápsula total e de alta afinidade. Estas respostas imunes serão determinadas geralmente aproximadamente 4 semanas depois da administração da composição, e em comparação com valores determinados antes da administração da composição. Prefere-se um aumento de SBA de pelo menos 4 vezes ou 8 vezes. Se é administrada mais de uma dose da composição pode ser feita mais de uma determinação pós-tratamento.

As composições preferidas da invenção podem conferir um titulação de anticorpos num paciente que é superior ao critério para a soroprotecção para cada componente antigénico para um percentagem aceitável de indivíduos humanos. São muito conhecidos os antigénios com um titulação de anticorpos associado acima do qual um hospedeiro é considerado que está soroconvertido contra o antigénio, e tais titulações são publicados por organizações tais como a OMS. Preferentemente mais de 80% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos está soroconvertida, mais preferentemente mais de 90%, ainda mais preferentemente mais de 93%, e o mais preferentemente 96-100%. As composições da invenção serão administradas geralmente directamente a um paciente. A administração directa pode ser levada a cabo por injeção parentérica (por exemplo, subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente ou ao espaço intersticial de um tecido), ou por administração rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar ou outra mucosa.

Prefere-se a administração intramuscular ao coxa ou ao braço superior. A injeção pode via uma agulha (por exemplo, uma agulha hipodérmica), mas como alternativa pode ser utilizada injeção sem agulha. Uma dose intramuscular típica é 0,5 ml.

A invenção pode ser utilizada para provocar imunidade sistémica e/ou mucosa.

O tratamento de dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de dose múltipla. A dose múltipla pode ser utilizada num programa de imunização primária e/ou num programa de reforço da imunização. Um programa de dose primária pode ir seguido de um programa de dose de reforço. O momento adequado entre duas doses de sensibilização (por exemplo, entre 4-16 semanas), e entre a sensibilização e o reforço, pode ser determinado rotineiramente.

As infecções por *Neisseria* afectam diversas áreas do corpo e, portanto, as composições da invenção podem ser preparadas de diversas formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injectáveis, tanto como soluções líquidas como suspensões. A composição pode ser preparada para administração pulmonar, por exemplo, como um inalador, utilizando um pó fino ou um spray. A composição pode ser preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, auditiva ou ocular, por exemplo, como spray, gotas, gel ou pó [por exemplo, as refs. 210 e 211]. Foi informado o sucesso com a administração nasal de sacáridos pneumocócicos [212, 213], polipéptidos pneumocócicos [214], sacáridos de Hib [215], sacáridos de MenC [216] e misturas de conjugados de sacáridos de Hib e MenC [217].

Estabilidade durante o armazenamento

As composições da invenção oferecem uma estabilidade melhorada, particularmente para o componente de sacárido do serogrupo A. O presente pedido divulga um processo para preparar uma composição de vacina que compreende as etapas de: (1) misturar (i) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo C, (ii) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo W135, (iii) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo Y e (iv) um ou mais antigénios de polipéptidos do serogrupo B; (2) guardar a composição resultante da etapa (1) durante pelo menos 1 semana; (3) preparar uma seringa que contém a composição armazenada da etapa (2) pronta para injeção a um paciente; e, opcionalmente (4) injectar a composição ao paciente.

A etapa (I) também pode envolver misturar (v) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo A. Num aspecto da invenção também envolve misturar (vi) um antigénio sacarídeo capsular conjugado de Hib. Também pode envolver misturar (vii) um antigénio pneumocócico. A etapa (2) implica preferentemente pelo menos 2 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas ou mais de armazenamento. A etapa de armazenamento (2) pode ou pode não estar abaixo da temperatura ambiente (por exemplo, a $10\pm 10^{\circ}\text{C}$).

O pedido também divulga um processo para preparar uma composição de vacina que compreende as etapas de: (1) misturar (i) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo C, (ii) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo W135, (iii) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo Y e (iv) um ou mais antigénios de polipéptidos do serogrupo B; e (2) extrair um volume de dose unitária dos antigénios; e (c) embalar a dose unitária extraída num recipiente hermeticamente fechado.

A etapa (I) também pode implicar misturar (v) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo A. Num aspecto da invenção também implica misturar (vi) um antigénio sacarídeo capsular conjugado de Hib. Também pode implicar misturar (vii) uma antigénio pneumocócico. O recipiente hermeticamente fechado pode ser um frasco ou uma seringa.

A invenção proporciona um recipiente hermeticamente fechado que contém uma composição da invenção.

Informação geral

O termo “que compreende” significa “que inclui”, além disso de “consiste em”, por exemplo, uma composição “que compreende” X pode consistir em exclusivamente X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + E.

O termo “aproximadamente” em relação com um valor numérico x significa, por exemplo, $x \pm 10\%$.

A palavra “substancialmente” não exclui “completamente”, por exemplo, uma composição que está “substancialmente livre” de Y pode estar completamente livre de Y. Se é necessário, a palavra “substancialmente” pode ser omitida da definição da invenção.

As referências a uma identidade de sequências em percentagem entre duas sequências de aminoácidos significa que, quando são alinhadas, essa percentagem de aminoácidos é a mesma comparando as duas sequências. Este alinhamento e a homologia ou identidade de sequências em percentagem pode ser determinada utilizando programas de software conhecidos na técnica, por exemplo, aqueles descritos em secção 7,7.18 da referência 218. Um alinhamento preferido é determinado pelo algoritmo de pesquisa de homologias de Smith-Waterman utilizando uma pesquisa de “affine gap” com os seguintes parâmetros: *gap open penalty* = 12 (função do custo de

abertura de espaçamento), *gap extension penalty* = 2 (função de custo de extensão de espaçamento) e matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é ensinada na referência 219.

O termo "alquilo" refere-se a grupos alquilo em formas tanto lineares como ramificadas. O grupo alquilo pode estar interrompido com 1, 2 ou 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- ou -S-. O grupo alquilo também pode estar interrompido com 1, 2 ou 3 ligações duplas e/ou triplas. No entanto, o termo "alquilo" normalmente refere-se a grupos alquilo que não têm interrupções de heteroátomos ou interrupções de duplas ou triplas ligações. Quando se faz referência a alquilo C₁₋₁₂ indica-se que o grupo alquilo pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 1 e 12 (por exemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). Similarmente, quando se faz referência a alquilo C₁₋₆ indica-se que o grupo alquilo pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 1 e 6 (por exemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

O termo "cicloalquilo" inclui grupos cicloalquilo, policicloalquilo e cicloalqueno, além de combinações destes com grupos alquilo tais como grupos cicloalquilalquilo. O grupo cicloalquilo pode estar interrompido com 1, 2 ou 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- ou -S-. No entanto, o termo "cicloalquilo" normalmente refere-se a grupos cicloalquilo que não têm interrupções de heteroátomos. Exemplos de grupos cicloalquilo incluem grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo e adamantilo. Quando se faz referência a cicloalquilo C₃₋₁₂ indica-se que o grupo cicloalquilo pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 3 e 12 (por exemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

O termo "arilo" refere-se a um grupo aromático tal como fenilo ou naftilo. Quando se faz referência a arilo C₅₋₁₂ indica-se que o grupo arilo pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 5 e 12 (por exemplo, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

O termo "aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆" refere-se a grupos tais como benzilo, feniletilo e naftilmetilo.

Grupos protectores de azoto incluem grupos sililo (tais como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tais como ftalimidas, trifluoroacetamidas, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo (Boc), benziloxicarbonilo (Z ou Cbz), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tais como β-trimetilsililetanosulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C₁₋₁₂, benzilo, benzhidrilo, tritilo, 9-fenilfluorenilo, etc. Um grupo protector de azoto preferido é Fmoc.

As sequências incluídas para facilitar a clonagem ou purificação, etc., não contribuem necessariamente à invenção e podem ser omitidas ou eliminadas.

Se apreciará que podem existir anéis de açúcar em forma aberta e cerrada e que, enquanto que as formas fechadas mostram-se em fórmulas estruturais no presente documento, as formas abertas também estão englobadas pela invenção.

Os polipéptidos da invenção podem ser preparados por diversos meios (por exemplo, expressão recombinante, purificação de cultura celular, síntese química (pelo menos em parte), etc.) e em diversas formas (por exemplo, nativo, fusões, não glicosilados, lipidados, etc.). São preparados preferentemente em forma substancialmente pura (isto é, substancialmente livre de outras proteínas de N.

meningitidis ou de células hospedeiras). Embora a expressão do polipéptido possa ocorrer em *Neisseria*, prefere-se um hospedeiro heterólogo. O hospedeiro heterólogo pode ser procariota (por exemplo, uma bactéria) ou eucariota. Preferentemente é *E. coli*, mas outros hospedeiros adequados incluem *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (por exemplo, *M. tuberculosis*), levedura, etc.

O ácido nucleico de acordo com a invenção pode ser preparados de muitas formas (por exemplo, por síntese química (pelo menos em parte) a partir de bibliotecas genómicas ou de ADNc, a partir do próprio organismo, etc.) e pode tomar diversas formas (por exemplo, de cadeia simples, de cadeia dupla, vectores, sondas, etc.). São preparados preferentemente em forma substancialmente pura (isto é, substancialmente livre de outros ácidos nucleicos de *N. meningitidis* ou de células hospedeiro). O termo "ácido nucleico" inclui ADN e ARN, e também seus análogos, tais como aqueles que contêm esqueletos modificados (por exemplo, fosforotioatos, etc.), e também ácidos nucleicos de péptido (PNA), etc. A invenção inclui ácido nucleico que compreende sequências complementárias às descritas anteriormente (por exemplo, para propósitos antisense ou de sondagem).

Depois do serogrupo, a classificação meningocócica inclui sorotipo, sorosubtipo e em seguida imunotipo, e a nomenclatura padrão enumera serogrupo, sorotipo, sorosubtipo e imunotipo, cada um separado por dois pontos, por exemplo, B:4:P1,15:L3,7,9. Dentro do serogrupo B, algumas linhagens produzem frequentemente doença (hiperinvasiva), algumas linhagens produzem formas mais graves de doença que outras (hipervirulentas), e outras

raramente produzem doença em absoluto. São reconhecidas sete linhagens hipervirulentas, concretamente os subgrupos I, III e IV-1, complexo ET-5, complexo ET-37, conjunto A4 e linhagem 3. Estes foram definidos por meio de electroforese de enzimas multilocus (MLEE), mas também foi utilizada a tipagem de sequências multilocus (MLST) para classificar meningococos [ref. 104].

Modos para levar a cabo a invenção

Proteína híbrida Δ G287-953

A proteína 287 que codifica ADN da estirpe 394/98 meningocócica do serogrupo B e a proteína 953 da estirpe 2996 meningocócica do serogrupo B foram digeridas e ligadas, junto com uma sequência *linker* curta, dando um plasmídeo que codificava a sequência de aminoácidos SEQ ID 7. O plasmídeo foi transfectado em *E. coli* e as bactérias foram cultivadas para expressar a proteína. Depois do crescimento adequado, as bactérias foram colhidas e a proteína foi purificada. A partir da cultura, as bactérias foram centrifugadas e o sedimento foi homogeneizado em presença de tampão acetato 50 mM (pH 5) com uma relação em volume de precipitado:tampão de 1:8. A lise foi realizada utilizando um homogeneizador a alta pressão (AVESTIN, 4 ciclos a 14000 psi). Depois da lise foi adicionada ureia a uma concentração final de 5 M, seguido de agitação durante 1 hora a temperatura ambiente. O pH foi reduzido de 6 a 5 utilizando tampão acetato 200 mM (pH 4) + ureia 5 M. A mistura foi centrifugada a 16800 g durante 60 minutos a 2-8°C. O sobrenadante foi colhido e filtrado por SARTOBRAN P (0,45-0,22 μ m de SARTORIUS). A proteína no sobrenadante filtrado foi estável durante pelo menos 30 dias a -20°C e durante pelo menos 15 dias a 2-8°C.

A proteína foi purificada adicionalmente numa coluna de permuta catiónica (SPFF, Amersham Biosciences) com eluição utilizando NaCl 350 mM + acetato 50 mM + ureia 5 M a pH 5,00. A maioria das impurezas estavam presentes no fluxo contínuo. Uma lavagem de pré-eluição utilizando uma menor concentração de NaCl (180 mM) eliminou vantajosamente duas proteínas de *E. coli* contaminante.

O material eluído foi ajustado a pH 8 (utilizando TRIS 200 mM/HCl + ureia 5 M a pH 9) e foi purificado adicionalmente sobre uma coluna de Q Sepharose HP (Amersham) com eluição utilizando NaCl 150 mM + TRIS 20 mM/HCl a pH 8,00 em ureia 5 M. De novo, uma lavagem de pré-eluição com sal reduzido (90 mM) foi útil para eliminar impurezas.

O material eluído filtrado da coluna Q HP foi diluído 1:2 utilizando PBS a pH 7,00 (NaCl 150 mM + fosfato de potássio 10 mM, pH 7,00) e em seguida se diafiltrou contra 10 volumes de PBS a pH 7,00 por meio de ultrafiltração tangencial. Ao final da diafiltração o material foi concentrado 1,6 vezes a aproximadamente 1,2 mg/ml de proteínas totais. Utilizando uma membrana de 3 0,000 Da de corte (membrana de celulose regenerada de 50 cm², Millipore PLCTK 30) foi possível dializar o material com um rendimento de aproximadamente 90%.

Proteína híbrida 936-ΔG741

A proteína 936 que codifica ADN da estirpe 2996 meningocócica do serogrupo B e a proteína 741 da estirpe MC58 meningocócica do serogrupo B foram digeridas e ligadas, junto com uma sequência *linker* curta, dando um plasmídeo que codificava a sequência de aminoácidos SEQ ID 8. O plasmídeo foi transfectado em *E. coli* e as bactérias foram cultivadas para expressar a proteína. A proteína

recombinante não foi secretado, mas permaneceu solúvel dentro das bactérias.

Depois do crescimento adequado, as bactérias foram centrifugadas dando uma pasta húmida e foram tratadas do seguinte modo:

- Homogeneização por meio de um sistema a alta pressão em presença de fosfato de sódio 20 mM a pH 7,00.

- Centrifugação e clarificação por filtração ortogonal.

- Cromatografia em coluna catiónica (SP Sepharose Fast Flow), com eluição com NaCl 150 mM em fosfato de sódio 20 mM a pH 7,00.

- Cromatografia em coluna aniónica (Q Sepharose XL) com recolha em fluxo contínuo.

- Cromatografia em coluna hidrófoba (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) com eluição com fosfato de sódio 20 mM, pH 7,00.

- Diafiltração contra PBS a pH 7,4 com um corte de 10 Kd.

- Esterilização por filtração final e armazenamento a -20°C

A proteína no material final foi estável durante pelo menos 3 meses tanto a -20°C como a 2-8°C.

Proteína NcidA^(NL) (C)

A proteína NadA que codifica ADN da estirpe 2996 meningocócica do serogrupo B foi digerida para eliminar a sequência que codificava sua extremidade C dando um plasmídeo que codificava a sequência de aminoácidos SEQ ID 1. O plasmídeo foi transfetado em *E. coli* e as bactérias foram cultivadas para expressar a proteína. A proteína recombinante foi secretada no meio de cultura e o péptido líder esteve ausente da proteína secretada (SEQ ID 2). O sobrenadante foi tratado do seguinte modo:

- Concentração 7X e diafiltração contra tampão TRIS 20 mM/HCl a pH 7,6 por UF de fluxo cruzado (corte de 30 Kd).
- Cromatografia em coluna aniônica (Q Sepharose XL) com eluição com NaCl 400 mM em TRIS 20 mM/HCl a pH 7,6.
- Etapa de cromatografia em coluna hidrófoba (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) com eluição com NaCl 50 mM em TRIS/HCl a pH 7,6.
- Cromatografia em coluna cerâmica de hidroxilapatita (HA Macro. Prep) com eluição com fosfato de sódio 200 mM a pH 7,4.
- Diafiltração (corte de 30 Kd) contra PBS a pH 7,4
- Esterilização por filtração final e armazenamento a -20°C

A proteína no material final foi estável durante pelo menos 6 meses tanto a -20°C como a 2-8°C.

A proteína NadA é susceptível a degradação, e formas truncadas de NadA podem ser detectadas por transferência Western ou por espectrometria de massa (por exemplo, por MALDI-TOF) que indica até uma perda de 10 kDa de MW. Os produtos de degradação podem ser separados da NadA nativa por filtração em gel (por exemplo, utilizando a coluna TSK 300SWXL, pré-coluna TSKSWXL, TOSOHAAS). Tal filtração dá três picos: (i) um primeiro pico com tempo de retenção de 12,637 min e MW aparente de 885,036 Da; (ii) tempo de retenção de 13,871 min e MW aparente de 530,388 Da; (iii) tempo de retenção 13,871 min e MW aparente de 530,388 Da. A análise de dispersão da luz dos três picos revela valores de MW reais de (i) 208500 Da, (ii) 98460 Da, (iii) 78760 Da. Portanto, o primeiro pico contém agregados de NadA e o terceiro pico contém produtos de degradação.

Como o peso molecular predito de NadA^(NL)(C) é 34,113 Da, o pico (ii) contém uma proteína trimérica que é o antigénio desejado.

Combinações antigénicas

Foram imunizados ratinhos com uma composição que compreendia as três proteínas e, para propósitos de comparação, as três proteínas também foram testadas individualmente. Foram utilizados dez ratinhos por grupo. A mistura pôde induzir altos titulações bactericidas contra diversas estirpes:

	Estirpe meningocócica (serogrupo)							
	2996 (B)	MC58 (B)	NGH38	394/98 (B)	H44/76 (B)	F6124 (A)	BZ133 (C)	C11 (C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000
Mistura	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
'-' indica que esta estirpe não contém o gene NadA								

Observando ratinhos individuais, a triple mistura induziu titulações bactericidas altas e coerentes contra as três estirpes do serogrupo B das quais são derivados os antigénios individuais:

nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

Combinação e comparação com OMV

Em outras experiências, os antigénios (20 µg de cada antigénio por dose) foram administrados em combinação com 10 µg de OMV preparadas tanto a partir da estirpe H44/76 (Noruega) como a estirpe 394/98 (Nova Zelândia). Os controlos positivos foram o mAb anti-SEAM-3 capsular para o serogrupo B ou os conjugados CRM 197-sacáridos capsulares para outras estirpes. A mistura quase sempre deu melhores titulações que as OMV simples, e a adição da mistura a OMV quase sempre potenciou significativamente a eficácia das OMV. Em muitos casos, a mistura de antigénios igualou ou superou a resposta observada com o controlo positivo.

Testes de linhagem hipervirulento

Foram testadas os seguintes antigénios contra uma variedade de estirpes do serogrupo B a partir de uma variedade de linhagens hipervirulentas:

- (a) NadA^{(NL) (C)}
- (b) ΔG287-953
- (c) 936-ΔG741
- (d) uma mistura de (a), (b) e (c)
- (e) OMV preparadas a partir da estirpe H44/76 (Noruega)
- (f) OMV preparada a partir da estirpe 394/98 (Nova Zelândia)
- (g) uma mistura de ΔG287 e (e)
- (h) uma mistura de (d) e (e)
- (i) uma mistura de (d) e (f)

SEAM-3 foi utilizada como controlo positivo.

Os resultados foram do seguinte modo, expressos como a percentagem de estirpes na linhagem hipervirulenta indicada quando a titulação bactericida em soro superou 1024:

	Nº de estirpes	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	4	50	50	0	100	25	25	25	100	100	+
ET-5	8	25	75	88	100	71	14	71	100	100	+
Linhagem 3	13	0	75	15	93	8	85	8	92	93	+
ET-37	4	11	22	0	33	0	0	0	22	25	+

Contra estirpes de referência particulares, as titulações bactericidas foram do seguinte modo:

	Estirpe	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	961-5945	128	2048	<8	2048	262144	8192	262144	162144	4096	8192
ET-5	44/76	<4	2048	32768	131072	524288	8192	524288	524288	524288	16384
Linhagem 3	394/98	<4	1024	32	4096	<4	16384	256	16384	16384	16384
ET-37	LPN17592	2048	1024	256	4096	<8	<8	512	16384	65536	1024

Portanto, as composições (d), (h) e (i) induzem respostas de anticorpos bactericidas contra uma ampla variedade de estirpes de meningococo do serogrupo B dentro das linhagens hipervirulentas A4, ET-5 e linhagem 3. As titulações utilizando as composições (h) e (i) foram geralmente superiores a com (d), mas a cobertura das estirpes dentro das linhagens hipervirulentas A4, ET-5 e linhagem 3 não foi melhor.

A cobertura de estirpes sem tipificar também foi alta com as composições (d), (h) e (i).

Combinação com conjugados meningocócicos e/ou de Hib

A composição de MenB tripla é combinada com uma mistura de conjugados de oligossacáridos para os serogrupos C, W135 e Y dando uma vacina que contém os seguintes antigénios:

Componente	Quantidade por 0,5 ml de dose
Conjugado de serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
ΔG287-953	20 µg de polipéptido
936-ΔG741	20 µg de polipéptido
NadA	20 µg de polipéptido

Prepara-se uma vacina similar que inclui conjugado de MenA (10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM₁₉₇) e/ou um conjugado de Hib HbOC (10 µg de sacárido + 2-5 µg de CRM₁₉₇).

Numa série de testes foram combinados os conjugados dos serogrupos C, W135 e Y, estando cada conjugado presente a 40 µg/ml (medido como sacárido). Para o armazenamento antes de utilização com antigénios de MenB, os conjugados

combinados foram liofilizados [-45°C durante 3 horas, -35°C durante 20 horas a 50 mTorr a vácuo, 30°C durante 10 horas a 50 mTorr, 30°C durante 9 horas a 125 mTorr] em presença de 15 mg de sacarose, tampão fosfato 10 mM (pH 7,2). O volume final antes da liofilização foi 0,3 ml. Portanto, depois da ressuspensão em 0,6 ml de solução aquosa, os sacáridos estão presentes a 12 µg por serogrupo. A liofilização foi utilizada somente por comodidade, e nem a eficácia nem a estabilidade durante o armazenamento normal do produto final requerem liofilização.

Foi preparado um segundo lote de material da mesma forma, mas também incluindo o conjugado do serogrupo à mesma dosagem de sacárido que para os serogrupos C, W135 e E.

Foi preparado um terceiro lote de material da mesma forma (serogrupos A, C, W135 e Y), mas também incluindo um conjugado de Hib-CRM₁₉₇ à mesma dosagem de sacárido que para os meningococos.

Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8
NadA ^{(NL) (C)} µg/dose	20			20	20	20	20	20
936-741 µg/dose	20			20	20	20	20	20
287-953 µg/dose	20			20	20	20	20	20
MenA-CRM µg/dose*		2,4	2,4	2,4			2,4	2,4
MenC-CRM µg/dose*		2,4	2,4		2,4	2,4	2,4	2,4
MenW-CRM µg/dose*		2,4	2,4			2,4	2,4	2,4
MenY-CRM µg/dose*		2,4	2,4			2,4	2,4	2,4
Hib-CRM µg/dose*			2,4					2,4
Hidróxido de alumínio mg/dose	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Histidina mM	10	10	10	10	10	10	10	10
Sacarose mg/dose		3	3	3		3	3	3
Manitol mg/dose					1,8			

Fosfato de potássio a pH 7,2 mM		3	3	3		3	3	3
Fosfato de sódio a pH 7,2 mM					3			
Cloreto de sódio mg/dose	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
* A quantidade mostrada é sacárido								

Para a comparação foram preparadas preparações liofilizadas dos conjugados do serogrupo A e C. O material de MenA foi liofilizado com 15 mg de sacarose dando uma dose de 12 µg de sacárido depois da reconstituição como foi descrito anteriormente. O material de MenC foi liofilizado com 9 mg de manitol dando uma dose de 12 µg de sacárido depois da reconstituição.

Estes materiais foram combinados com 600 µl da mistura de serogrupos (d) (ou, como controlo, isto é, os grupos 2 e 3, numa composição idêntica mas que não possui dos antigénios) dando oito composições:

Estas composições foram administradas intraperitonealmente num volume de 200 µl a CD/1 ratinhos (8 por grupo) nos dias 0, 21 e 35, com uma sangria final no dia 49. Os soros do dia 49 foram testados em ensaios de SBA contra uma variedade de estirpes meningocócicas nos serogrupos A, B, C, W135 e E. Os resultados foram:

Grupo	B				A	C				W135	Y
	2996	MC58	394/98	44/76	F6124	C11	312294	C4678	M1569	LPN17592	860800
1	1024	4096	1024	8192	2048	2048	<16*	64*	128*	512	65536
2	<4	<4	128	<16	4096	8192	-	-	-	32	32768
3	<4	<4	<4	<16	4096	16384	-	-	-	512	32768
4	64	4096	512	8192	8192	128	-	-	-	256	32768
5	256	4096	1024	8192	256	8192	>8192	>8192	>8192	512	32768
6	128	1024	256	8192	128	8192	8192	>8192	>8192	512	16384
7	256	512	512	16384	1024	8192	4096	>8192	>8192	1024	16384
8	256	2048	512	8192	1024	8192	2048	>8192	>8192	512	32768

Portanto, o antigénio meningocócico de proteínas continua sendo eficaz inclusive depois da adição dos antigénios sacarídeos meningocócicos e de Hib conjugados. Similarmente, os conjugados meningocócicos retêm a eficácia inclusive depois da adição dos antigénios de proteínas. De facto, os dados sugerem que a adição dos antigénios de proteínas aos conjugados potencia a eficácia anti-MenW135 (vejam-se os grupos 2 e 7).

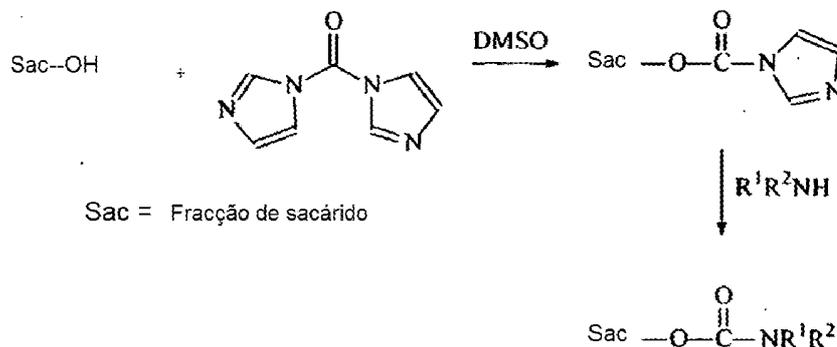
Além disso, existe um nível de reactividade cruzada, em particular para o serogrupo Y, já que os antigénios de proteínas solos dão uma boa titulação anti-MenY [veja-se a referência 220] como os grupos 4 e 5.

Os dados também indicam que a adição de um conjugado de Hib a conjugados meningocócicos (vejam-se os grupos 2 e 3) potencia a actividade anti-W135.

Utilização de sacarido de MenA modificado

O polissacárido capsular foi purificado a partir de MenA e foi hidrolisado dando o oligossacárido de MenA. O polissacárido (2 g) foi hidrolisado a 50°C em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,75, a uma concentração de polissacárido de 10 mg/ml durante aproximadamente 4 horas [73]. Depois da hidrólise, a solução foi seca por meio de evaporação rotatória.

O oligossacárido foi activado utilizando o seguinte esquema de reacção:



O oligossacárido foi dissolvido em DMSO dando uma concentração de sacárido de 10 mg/ml. De acordo com uma relação molar de oligossacárido:CDI que é 1:20, em seguida foram adicionados 21,262 g de CDI e a mistura de reacção foi agitada durante 16 horas a temperatura ambiente. O composto MenA-CDI resultante foi purificado por meio de precipitação selectiva numa mistura de 80:20 (v/v) de acetona:DMSO seguido de centrifugação. Foi calculado que a eficiência da reacção de activação era aproximadamente 67,9% determinando a relação de imidazol livre com respeito a imidazol ligado.

Na segunda etapa de reacção, o oligossacárido de MenA-CDI foi solubilizado em DMSO a uma concentração de sacárido de aproximadamente 10 mg/ml. De acordo com uma relação molar de unidade de MenA-CDI:DMA que é 1:100 foram adicionados 36,288 g de cloridrato de dimetilamina a 99% (isto é, R^1 e $\text{R}^2 = \text{Me}$) e a mistura de reacção foi agitada durante 16 horas a temperatura ambiente. O produto de reacção foi liofilizado e se ressolubilizado em 10 mg/ml de solução de água.

Para eliminar o reagente de reacção de baixo peso molecular (em particular a dimetilamina (DMA)) da preparação de oligossacáridos foi realizada uma etapa de diálise através de uma membrana de MWCO de 3,5 kDa (Spectra/Por[™]). Foram levadas a cabo quatro etapas de

diálise: (i) 16 horas contra 2 l de cloreto de sódio 1 M (factor de diálise 1:20), (ii) 16 horas contra 2 l de cloreto de sódio 0,5 M (factor de diálise 1:20), (iii) e (iv) 16 horas contra 2 l de WFI (factor de diálise 1:20). Para melhorar a purificação também foi realizada uma etapa de diafiltração através de uma membrana de MWCO de 1 kDa (Centricon™).

O produto de MenA-CDI-DMA purificado foi tamponado a pH 6,5 em L-histidina 25 mM (Fluka™).

Para preparar conjugados do sacárido de MenA modificado (MenA-CDI-DMA), o processo global foi do seguinte modo:

- hidrólise do polissacárido dando fragmentos de oligossacáridos
- dimensionamento dos fragmentos de oligossacáridos
- aminação redutora de grupos aldeído terminais sobre os oligossacáridos dimensionados
- protecção de grupos $-NH_2$ terminais pelo grupo Fmoc antes da reacção de CDI
- desprotecção intrínseca de grupos $-NH_2$ durante a reacção de DMA
- activação de grupos $-NH_2$ terminais por SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimida-adípico)
- união covalente à proteína CRM₁₉₇

O conjugado de oligossacárido de MenA modificado foi muito mais resistente à hidrólise que seu homólogo natural a temperaturas elevadas. Depois de 28 dias a 37°C, por exemplo, a percentagem de sacárido libertado é 6,4% para o oligossacárido modificado versus 23,5% para o antigénio natural. Além disso, as titulações induzidos pelos oligossacáridos modificados não são significativamente menores que aqueles obtidos utilizando as estruturas de açúcar nativa.

O conjugado de MenA modificado é combinado com conjugados de MenC, MenW135 e MenY como substituto do conjugado de oligossacárido sem modificar. Esta mistura tetravalente se mistura com os três polipéptidos de MenB dando uma vacina eficaz contra os serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis* numa dose única.

Combinações pneumocócicas

As três proteínas de MenB combinadas são misturadas com conjugados de sacáridos pneumocócicos dando uma concentração final de 2 µg/dose de cada um dos sorotipos pneumocócicos (duplo para o sorotipo 6B). Portanto, a vacina reconstituída contém os seguintes antigénios:

Componente	Quantidade por 0,5 ml de dose
Conjugado de serogrupo A	5 µg de sacárido + 6,25-16,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo C	5 µg de sacárido + 6,25-12,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo W 135	5 µg de sacárido + 3,3-10 µ de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo Y	5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado do sorotipo 4 de pneumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado do sorotipo 9V de pneumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado do sorotipo 14 de pneumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado do sorotipo 18C de pneumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado do sorotipo 19F de pneumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado do sorotipo 23F de pneumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado do sorotipo 6B de pneumococo	4 µg de sacárido + 5 µg de CRM ₁₉₇

Será entendido que a invenção somente foi descrita por meio de exemplo e que podem ser feitas modificações

enquanto sigam dentro do alcance da invenção, que foi definido nas reivindicações adjuntas.

REFERÊNCIAS

- [1] Darkes e Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- [2] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [3] Armand *et al.* (1982) *J. Biol. Stand* 10:335-339.
- [4] Cadoz *et al.* (1985) *Vaccine* 3:340-342.
- [5] Baklaic *et al.* (1983) *Infect. Immun.* 42:599-604.
- [6] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
- [7] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-96
- [8] Frash (1990) p. 123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi e Van Wezel)
- [9] WO03/007985.
- [10] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- [11] WO02/058737.
- [12] Pedido de patente de RU GB-040897 8,5. [ref. do procurador: P037501GB].
- [13] Kandil *et al.* (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
- [14] Berkin *et al.* (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
- [15] Glode *et al.* (1979) *J Infect Dis* 139:52-56
- [16] WO94/05325; patente de E.U.A. 5,42 5,946.
- [17] W02005/033148.
- [18] WO03/080678.
- [19] Nilsson e Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
- [20] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [21] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [22] BATTERY e MOXON (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [23] Ahmad e Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [24] Goldblatt (1998) *J. Med Microbiol.* 47:563-567.

- [25] European patent 0477508.
- [26] Patente dos E.U.A. 5,30 6,492.
- [27] WO98/42721.
- [28] Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.
- [29] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 ou 012342335X.
- [30] Anonymous (Jan 2002), 453077.
- [31] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- [32] Anderson et al. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- [33] EP-A-0372501.
- [34] EP-A-0378881.
- [35] EP-A-0427347.
- [36] WO93/17712
- [37] WO94/03208.
- [38] WO98/58668.
- [39] EP-A-0471177.
- [40] WO91/01146
- [41] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [42] Baraldo et ao, (2004) Infect Immun.72:4884-7
- [43] EP-A-0594610.
- [44] WO00/56360.
- [45] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [46] WO02/091998.
- [47] WO01/72337
- [48] WO00/61761.
- [49] WO2004/083251.
- [50] WO99/42130
- [51] WO96/40242
- [52] Lees et al. (1996) Vaccine 14:190-198.
- [53] WO95/08348.
- [54] Patente de E.U.A. 4,88 2,317
- [55] Patente de E.U.A. 4,69 5,624

- [56] Porro *et al.* (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.
- [57] EP-A-0208375
- [58] WO00/10599
- [59] Gever *et al.* *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
- [60] Patente dos E.U.A. 4.057.685.
- [61] Patentes dos E.U.A. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [62] Patente dos E.U.A. 4.459.286.
- [63] Patente dos E.U.A. 4.965.338
- [64] Patente dos E.U.A. 4.663.160.
- [65] Patente dos E.U.A. 4.761.283
- [66] Patente dos E.U.A. 4.356.170
- [67] Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- [68] WO00/38711; patente dos E.U.A. 6,14 6,902.
- [69] Lamb *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:251-258.
- [70] Lamb *et al.* (2000) *Journal of Chromatography A* 894:311-318.
- [71] D'Ambra *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:241-242.
- [72] Ravenscroft *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [73] Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [74] Parkhill *et al.* (2000) *Nature* 404:502-506.
- [75] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [76] WO00/66791.
- [77] Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [78] WO99/24578.
- [79] WO99/36544.
- [80] WO99/57280.
- [81] WO00/22430.
- [82] WO00/66741.
- [83] WO01/64920.
- [84] WO01/64922.
- [85] WO03/020756.

- [86] W02004/014419.
- [87] W099/31132; patente dos E.U.A. 6.495.345.
- [88] W099/58683.
- [89] Peak *et al.* (2000) FEMS Immunol Med Microbiol 28:329-334.
- [90] W093/06861.
- [91] EP-A-0586266.
- [92] W092/03467.
- [93] Patente dos E.U.A. 5912336.
- [94] W02004/015099.
- [95] W02004/014418.
- [96] Pedidos de patente de RU 022374 1,0, 030583 1,0 e 030911 5,4; e W02004/032958.
- [97] Comanducci *et al.* (2002) J. Exp. Med. 195:1445-1454.
- [98] W003/010194.
- [99] W02004/048404
- [100] W003/063766.
- [101] Massignani *et al.* (2003) J Exp Med 197:789-799.
- [102] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- [103] Pettersson *et al.* (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
- [104] Maiden *et al.* (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- [105] Welsch *et al.* (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 *elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.*
- [106] Santos *et al.* (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Set. 1-6, 2002. *Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with*

novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of N. meningitidis.

[107] WO96/14086.

[108] Vaccines (eds. Plotkin e Mortimer), 1988. ISBN: 0-7216-1946-0

[109] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.

[110] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.

[111] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.

[112] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.

[113] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 e 79-80.

[114] WO93/24148.

[115] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.

[116] Zimmerman e Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.

[117] Charalambous e Feavers (2001) *J Med Microbiol* 50:937-939.

[118] Westerink (2001) *Int Rev Immunol* 20:251-261.

[119] Grothaus *et al.* (2000) *Vaccine* 18:1253-1263.

[120] Kanra *et al.* (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.

[121] Ravenscroft *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:35-47.

[122] WO97/00697.

[123] WO02/00249.

[124] WO96/37222; patente dos E.U.A. 6.333.036.

[125] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.

[126] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.

[127] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.

[128] Zielen *et al.* (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.

- [129] Tettelin *et al.* (2001) *Science* 293:498-506.
- [130] Hoskins *et al.* (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.
- [131] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
- [132] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.
- [133] Massignani *et al.* (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
- [134] Mora *et al.* (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- [135] Wizemann *et al.* (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [136] Rigden *et al.* (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.
- [137] WO02/22167.
- [138] Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [139] WO00/56365.
- [140] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20^a edição, ISBN: 0683306472.
- [141] WO03/009869.
- [142] Vaccine Design. (1995) eds. Powell e Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [143] WO00/23105.
- [144] WO90/14837.
- [145] Patente dos E.U.A. 5.057.540.
- [146] WO96/33739.
- [147] EP-A-0109942.
- [148] WO96/11711.
- [149] WO00/07621.
- [150] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [151] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [152] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
- [153] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [154] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [155] Gerber *et al.* (2001) *Virol* 75:4752-4760.

- [156] WO03/024480
- [157] WO03/024481
- [158] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [159] EP-A-0689454.
- [160] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [161] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [162] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [163] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [164] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [165] WO02/26757.
- [166] WO99/62923.
- [167] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [168] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [169] WO98/40100.
- [170] Patente dos E.U.A. 6.207.646.
- [171] Patente dos E.U.A. 6.239.116.
- [172] Patente dos E.U.A. 6.429.199.
- [173] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [174] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [175] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [176] WO01/95935.
- [177] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [178] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [179] WO03/035836.
- [180] WO95/17211.
- [181] WO98/42375.
- [182] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [183] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.

- [184] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [185] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [186] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [187] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [188] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [189] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [190] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [191] WO99/40936.
- [192] WO99/44636.
- [193] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [194] WO99/27960.
- [195] Patente dos E.U.A. 6.090.406
- [196] Patente dos E.U.A. 5.916.588
- [197] EP-A-0626169.
- [198] WO99/52549.
- [199] WO01/21207.
- [200] WO01/21152.
- [201] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [202] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [203] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [204] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [205] WO99/11241.
- [206] WO94/00153.
- [207] WO98/57659.
- [208] Pedidos de patente europeia 0835318, 0735898 e 0761231.
- [209] WO01/30390.

- [210] Almeida e Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.
- [211] Agarwal e Mishra (1999) Indian J Exp Biol 37:6-16.
- [212] WO00/53221.
- [213] Jakobsen *et al.* (2002) Infect Immun 70:1443-1452.
- [214] Wu *et al.* (1997) J Infect Dis 175:839-846.
- [215] Bergquist *et al.* (1998) APMIS 106:800-806.
- [216] Baudner *et al.* (2002) Infect Immun 70:4785-4790.
- [217] Ugozzoli *et al.* (2002) J Infect Dis 186:1358-1361.
- [218] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30.
- [219] Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
- [220] Pedido de patente de RU 040897 7,7. [ref. do procurador: P037500GB].

LISTA DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID	
1	NadA da estirpe 2996, com deleção da extremidade C
2	NadA da estirpe 2996, com deleção da extremidade C e péptido líder processado
3	Δ G741 da estirpe MC58
4	936 da estirpe MC58 com péptido líder processado
5	953 da estirpe MC58 com péptido líder processado
6	Δ G287 da estirpe MC58
7	Híbrido de 287-953
8	Híbrido de 936-741
9	<i>Linker</i>
10	Sequência de 741
11	Sequência de 741
12	Sequência de 741

<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS SRL
 <120> VACINAS LÍQUIDAS PARA MÚLTIPLOS SEROGRUPOS
 MENINGOCÓCICOS
 <130> P050770EP

<140> EP-08
 <141> 04-10-2004

<150> PCT/IB2004/003373
 <151> 04-10-2004

<150> GB032310 2,4
 <151> 02-10-2003

<150> GB041205 2,3
 <151> 28-05-2004

<160> 12

<170> SeqWin99, versão 1.02

<210> 1
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 1

Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys

20					25					30					
Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asn	Asn	Gly	Gln	Glu	Ile
		35					40					45			
Asn	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Glu	Asp	Gly
	50					55					60				
Thr	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	Val	Glu	Ala	Asp	Asp
	65					70					75				80
Phe	Lys	Gly	Leu	Gly	Leu	Lys	Lys	Val	Val	Thr	Asn	Leu	Thr	Lys	Thr
				85					90					95	
Val	Asn	Glu	Asn	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Glu
			100					105					110		
Ser	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Thr	Thr	Lys	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala
		115					120					125			
Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala	Leu	Asp	Ala	Thr	Thr	Asn	Ala	Leu	Asn
	130					135					140				
Lys	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Phe	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Thr	Asn
	145					150					155				160
Ile	Val	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Val	Asp
				165					170					175	
Lys	His	Ala	Glu	Ala	Phe	Asn	Asp	Ile	Ala	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Thr
			180					185					190		
Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Asn	Glu	Ala	Lys	Gln
		195					200					205			
Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala
	210					215					220				
Glu	Thr	Ala	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Asn	Thr
	225					230					235				240
Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Asp	Ile	Lys
				245					250					255	
Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys	Asp	Asn	Ile	Ala	Lys	Lys	Ala	Asn	Ser
			260					265					270		
Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Val	Arg	Ile
		275					280					285			
Asp	Gly	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Leu	Asp	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser
	290						295					300			
Ala	Glu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp	His	Asp	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Asp

305					310					315				320		
Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Leu	Ala	Glu	
				325					330					335		
			Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly
			340							345						350

<210> 2

<211> 327

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 2

Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu
 20 25 30
 Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala
 35 40 45
 Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys
 50 55 60
 Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn
 65 70 75 80
 Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr
 85 90 95
 Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala
 100 105 110
 Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr
 115 120 125
 Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys
 130 135 140
 Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala
 165 170 175
 Val Lys Thr Ala Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln
 180 185 190
 Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala
 195 200 205
 Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala

210		215		220															
Val	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys				
225					230					235					240				
Asp	Asn	Ile	Ala	Lys	Lys	Ala	Asn	Ser	Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Glu				
				245					250						255				
Glu	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Val	Arg	Ile	Asp	Gly	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr				
			260					265						270					
Glu	Lys	Leu	Asp	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp				
		275					280					285							
His	Asp	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg				
	290					295						300							
Lys	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu				
305					310					315					320				
Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly													
					325														

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
1 5 10 15

Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
20 25 30

Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
35 40 45

Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
50 55 60

Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
65 70 75 80

Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His
85 90 95

Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His
100 105 110

Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala
115 120 125

Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr

130

135

140

Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr
145 150 155 160

Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His
165 170 175

Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys
180 185 190

Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn
195 200 205

Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala
210 215 220

Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg
225 230 235 240

His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
245

<210> 4

<211> 179

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 4

Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala Val
 1 5 10 15

Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala Leu
 20 25 30

Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr
 35 40 45

Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asn Arg His Leu
 50 55 60

Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly
 65 70 75 80

Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile
 85 90 95

Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr
 100 105 110

Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala
 115 120 125

Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val

130

135

140

Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val
 145 150 155 160

Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr
 165 170 175

Val Gln Arg

<210> 5

<211> 168

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 5

Ala	Thr	Tyr	Lys	Val	Asp	Glu	Tyr	His	Ala	Asn	Ala	Arg	Phe	Ala	Ile
1				5					10					15	
Asp	His	Phe	Asn	Thr	Ser	Thr	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Tyr	Gly	Leu	Thr
			20				25						30		
Gly	Ser	Val	Glu	Phe	Asp	Gln	Ala	Lys	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Asp	Ile
		35					40					45			
Thr	Ile	Pro	Ile	Ala	Asn	Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Gln	His	Phe	Thr	Asp
	50					55					60				
His	Leu	Lys	Ser	Ala	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Pro	Asp	Ile
65					70					75					80
Arg	Phe	Val	Ser	Thr	Lys	Phe	Asn	Phe	Asn	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ser
				85					90					95	
Val	Asp	Gly	Asn	Leu	Thr	Met	His	Gly	Lys	Thr	Ala	Pro	Val	Lys	Leu
			100					105					110		
Lys	Ala	Glu	Lys	Phe	Asn	Cys	Tyr	Gln	Ser	Pro	Met	Glu	Lys	Thr	Glu
		115					120					125			
Val	Cys	Gly	Gly	Asp	Phe	Ser	Thr	Thr	Ile	Asp	Arg	Thr	Lys	Trp	Gly
	130					135					140				
Met	Asp	Tyr	Leu	Val	Asn	Val	Gly	Met	Thr	Lys	Ser	Val	Arg	Ile	Asp
145					150					155					160
Ile	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Lys	Gln								
				165											

<210> 6

<211> 464

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 6

Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala
 20 25 30
 Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met
 35 40 45
 Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala
 50 55 60
 Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln
 65 70 75 80
 Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro
 85 90 95
 Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu
 100 105 110
 Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly
 115 120 125
 Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr
 130 135 140
 Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser
 145 150 155 160
 Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser
 165 170 175
 Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro
 180 185 190
 Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly
 195 200 205
 Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys
 210 215 220
 Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn
 225 230 235 240
 Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile
 245 250 255
 Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg
 260 265 270
 Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro

Met	Ala	Ser	Pro	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Ala
1				5					10					15	
Ala	Pro	Val	Val	Ser	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Pro
			20					25					30		
Gln	Ala	Gly	Ser	Gln	Gly	Gln	Gly	Ala	Pro	Ser	Ala	Gln	Gly	Gly	Gln
		35					40					45			
Asp	Met	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Ala
	50					55					60				

Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
 65 70 75 80
 Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
 85 90 95
 Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala
 100 105 110
 Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala
 115 120 125
 Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly
 130 135 140
 Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala
 145 150 155 160
 Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser
 165 170 175
 Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
 180 185 190
 Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
 195 200 205
 Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe
 210 215 220
 Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly
 225 230 235 240
 Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser
 245 250 255
 Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys
 260 265 270
 Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
 275 280 285
 Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
 290 295 300
 Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile
 305 310 315 320
 Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
 325 330 335
 Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys
 340 345 350

Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
 355 360 365
 Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala
 370 375 380
 Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 405 410 415
 Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
 420 425 430
 Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 435 440 445
 Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460
 Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys
 465 470 475 480
 Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495
 Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510
 Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
 515 520 525
 Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540
 Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
 545 550 555 560
 Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
 565 570 575
 Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
 580 585 590
 Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
 595 600 605
 Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620
 Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640

Ala Ala Lys Gln

<210> 8

<211> 434

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 8

Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala
 1 5 10 15
 Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala
 20 25 30
 Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln
 35 40 45
 Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asn Arg His
 50 55 60
 Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val
 65 70 75 80
 Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr
 85 90 95
 Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp
 100 105 110
 Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro
 115 120 125
 Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr
 130 135 140
 Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys
 145 150 155 160
 Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn
 165 170 175
 Tyr Val Gln Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly
 180 185 190
 Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys
 195 200 205
 Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys
 210 215 220
 Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp
 225 230 235 240

Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp
 245 250 255
 Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser
 260 265 270
 Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe
 275 280 285
 Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala
 290 295 300
 Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe
 325 330 335
 Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala
 340 345 350
 Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu
 355 360 365
 Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His
 370 375 380
 Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser
 385 390 395 400
 Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser
 405 410 415
 Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala
 420 425 430

Lys Gln

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência *linker*

<400> 9

Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 10

<211> 255

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 10

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
 1. 5 10 15
 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
 20 25 30
 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
 35 40 45
 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
 50 55 60
 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
 65 70 75 80
 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
 85 90 95
 Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu
 100 105 110
 Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
 115 120 125
 Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
 130 135 140
 Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
 145 150 155 160
 Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
 165 170 175
 Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp
 180 185 190
 Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile
 195 200 205
 Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
 210 215 220
 Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
 225 230 235 240
 Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 245 250 255

<210> 11

<211> 254

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 11

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
 20 25 30
 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
 35 40 45
 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
 50 55 60
 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
 65 70 75 80
 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
 85 90 95
 Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu
 100 105 110
 Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser
 115 120 125
 Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
 130 135 140
 Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp
 145 150 155 160
 Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
 165 170 175
 His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
 180 185 190
 Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
 195 200 205
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 12

<211> 262

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 12

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys
 20 25 30
 Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn
 35 40 45
 Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala
 50 55 60
 Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr
 85 90 95
 Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asn His Ser
 100 105 110
 Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Thr
 115 120 125
 Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly
 130 135 140
 Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu Tyr His
 145 150 155 160
 Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser
 165 170 175
 Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys
 180 185 190
 Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp
 195 200 205
 Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu
 210 215 220
 Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile
 245 250 255
 Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 260

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 0200249 A [0007] [0217]
- WO 2004067030 A [0008]
- WO 03007985 A [0217]
- WO 02058737 A [0217]
- GB 0408978 A [0217]
- WO 9405325 A [0217]
- US 5425946 A [0217]
- WO 2005033148 A [0217]
- WO 03080678 A [0217]
- EP 0477508 A [0217]
- US 5306492 A [0217]
- WO 9842721 A [0217]
- EP 0372501 A [0217]
- EP 0378881 A [0217]
- EP 0427347 A [0217]
- WO 9317712 A [0217]
- WO 9403208 A [0217]
- WO 9858668 A [0217]
- EP 0471177 A [0217]
- WO 9101146 A [0217]
- EP 0594610 A [0217]
- WO 0056360 A [0217]
- WO 02091998 A [0217]
- WO 0172337 A [0217]
- WO 0061761 A [0217]
- WO 2004083251 A [0217]

- WO 9942130 A [0217]
- WO 9640242 A [0217]
- WO 9508348 A [0217]
- US 4882317 A [0217]
- US 4695624 A [0217]
- EP 0208375 A [0217]
- WO 0010599 A [0217]
- US 4057685 A [0217]
- US 4673574 A [0217]
- US 4761283 A [0217]
- US 4808700 A [0217]
- US 4459286 A [0217]
- US 4965338 A [0217]
- US 4663160 A [0217]
- US 4356170 A [0217]
- WO 0038711 A [0217]
- US 6146902 A [0217]
- WO 0066791 A [0217]
- WO 9924578 A [0217]
- WO 9936544 A [0217]
- WO 9957280 A [0217]
- WO 0022430 A [0217]
- WO 0066741 A [0217]
- WO 0164920 A [0217]
- WO 0164922 A [0217]
- WO 03020756 A [0217]
- WO 2004014419 A [0217]
- WO 9931132 A [0217]
- US 6495345 B [0217]
- WO 9958683 A [0217]
- WO 9306861 A [0217]
- EP 0586266 A [0217]
- WO 9203467 A [0217]
- US 5912336 A [0217]
- WO 2004015099 A [0217]

- WO 2004014418 A [0217]
- GB 0223741 A [0217]
- GB 0305831 A [0217]
- GB 0309115 A [0217]
- WO 2004032958 A [0217]
- WO 03010194 A [0217]
- WO 2004048404 A [0217]
- WO 03063766 A [0217]
- WO 9614086 A [0217]
- WO 9324148 A [0217]
- WO 9700697 A [0217]
- WO 9637222 A [0217]
- US 6333036 B [0217]
- WO 0222167 A [0217]
- WO 0056365 A [0217]
- WO 03009869 A [0217]
- WO 0023105 A [0217]
- WO 9014837 A [0217]
- US 5057540 A [0217]
- WO 9633739 A [0217]
- EP 0109942 A [0217]
- WO 9611711 A [0217]
- WO 0007621 A [0217]
- WO 03024480 A [0217]
- WO 03024481 A [0217]
- EP 0689454 A [0217]
- WO 0226757 A [0217]
- WO 9962923 A [0217]
- WO 9840100 A [0217]
- US 6207646 B [0217]
- US 6239116 B [0217]
- US 6429199 B [0217]
- WO 0195935 A [0217]
- WO 03035836 A [0217]
- WO 9517211 A [0217]

- WO 9842375 A [0217]
- WO 9940936 A [0217]
- WO 9944636 A [0217]
- WO 9927960 A [0217]
- US 6090406 A [0217]
- US 5916588 A [0217]
- EP 0626169 A [0217]
- WO 9952549 A [0217]
- WO 0121207 A [0217]
- WO 0121152 A [0217]
- WO 9911241 A [0217]
- WO 9400153 A [0217]
- WO 9857659 A [0217]
- EP 0835318 A [0217]
- EP 0735898 A [0217]
- EP 0761231 A [0217]
- WO 0130390 A [0217]
- WO 0053221 A [0217]
- GB 0408977 A [0217]
- US 2004003373 W [0218]
- GB 0323102 A [0218]
- GB 0412052 A [0218]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Darkes; Plosker.** Paediatr Drugs, 2002, vol. 4, 609-630 [0217]
- **Jones.** Curr Opin Investig Drugs, 2001, vol. 2, 47-49 [0217]
- **Armand et al.** J. Biol. Stand, 1982, vol. 10, 335-339 [0217]
- **Cadoz et al.** Vaccine, 1985, vol. 3, 340-342 [0217]
- **Baklaic et al.** Infect. Immun., 1983, vol. 42, 599-604 [0217]
- MMWR, 1997, vol. 46 (RR-5), 1-10 [0217]

- **Bjune et al.** Lancet, 1991, vol. 338 (8775), 1093-96 [0217]
- **Frash.** Advances in Biotechnological Processes. 1990, vol. 13, 123-145 [0217]
- **Inzana.** Infect. Immun., 1987, vol. 55, 1573-1579 [0217]
- **Kandil et al.** Glycoconj J, 1997, vol. 14, 13-17 [0217]
- **Berkin et al.** Chemistry, 2002, vol. 8, 4424-4433 [0217]
- **Glode et al.** J Infect Dis, 1979, vol. 139, 52-56 [0217]
- **Nilsson; Svensson.** Carbohydrate Research, 1979, vol. 69, 292-296 [0217]
- **Ramsay et al.** Lancet, 2001, vol. 357 (9251), 195-196 [0217]
- **Lindberg.** Vaccine, 1999, vol. 17 (2), 28-36 [0217]
- **Buttery; Moxon.** J R Coll Physicians Lond, 2000, vol. 34, 163-168 [0217]
- **Ahmad; Chapnick.** Infect Dis Clin North Am, 1999, vol. 13, 113-133vii [0217]
- **Goldblatt.** J. Med Microbiol., 1998, vol. 47, 563-567 [0217]
- Conjugate Vaccines. vol. 10, 48-114 [0217]
- **Hermanson.** Bioconjugate Techniques, 1996, ISBN 0123423368 [0217]
- **Anderson.** Infect Immun, 1983, vol. 39 (1), 233-238 [0217]
- **Anderson et al.** J Clin Invest, 1985, vol. 76 (1), 52-59 [0217]
- **Falugi et al.** Eur J Immunol, 2001, vol. 31, 3816-3824 [0217]
- **Baraldo et al.** Infect Immun., 2004, vol. 72, 4884-7 [0217]
- **Kuo et al.** Infect Immun, 1995, vol. 63, 2706-13 [0217]
- **Lees et al.** Vaccine, 1996, vol. 14, 190-198 [0217]

- **Porro et al.** Mol Immunol, 1985, vol. 22, 907-919 [0217]
- **Gever et al.** Med. Microbiol. Immunol, 1979, vol. 165, 171-288 [0217]
- **Lei et al.** Dev Biol (Basel), 2000, vol. 103, 259-264 [0217]
- **Lamb et al.** Dev Biol (Basel), 2000, vol. 103, 251-258 [0217]
- **Lamb et al.** Journal of Chromatography A, 2000, vol. 894, 311-318 [0217]
- **D'Ambra et al.** Dev Biol (Basel), 2000, vol. 103, 241-242 [0217]
- **Ravenscroft et al.** Vaccine, 1999, vol. 17, 2802-2816 [0217]
- **Costantino et al.** Vaccine, 1999, vol. 17, 1251-1263 [0217]
- **Parkhill et al.** Nature, 2000, vol. 404, 502-506 [0217]
- **Tettelin et al.** Science, 2000, vol. 287, 1809-1815 [0217]
- **Pizza et al.** Science, 2000, vol. 287, 1816-1820 [0217]
- **Peak et al.** FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, vol. 28, 329-334 [0217]
- **Comanducci et al.** J. Exp. Med., 2002, vol. 195, 1445-1454 [0217]
- **Masignani et al.** J Exp Med, 2003, vol. 197, 789-799 [0217]
- **Pettersson et al.** Microb Pathog, 1994, vol. 17 (6), 395-408 [0217]
- **Maiden et al.** PNAS USA, 1998, vol. 95, 3140-3145 [0217]
- **Welsch et al.** Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference. Norwegian Institute of Public Health, 01 de Setembro de 2002 [0217]

- **Santos et al.** Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference. Norwegian Institute of Public Health, 01 de Setembro de 2002 [0217]
- Vaccines. 1988 [0217]
- **Gustafsson et al.** N. Engl. J. Med., 1996, vol. 334, 349-355 [0217]
- **Rappuoli et al.** TIBTECH, 1991, vol. 9, 232-238 [0217]
- **Bell.** Pediatr Infect Dis J, 2000, vol. 19, 1187-1188 [0217]
- **Iwarson.** APMIS, 1995, vol. 103, 321-326 [0217]
- **Gerlich et al.** Vaccine, 1990, vol. 8, 63-6879-80 [0217]
- **Sutter et al.** Pediatr Clin North Am, 2000, vol. 47, 287-308 [0217]
- **Zimmerman; Spann.** Am Fam Physician, 1999, vol. 59, 113-118125-126 [0217]
- **Charalambous; Feavers.** J Med Microbiol, 2001, vol. 50, 937-939 [0217]
- **Westerink.** Int Rev Immunol, 2001, vol. 20, 251-261 [0217]
- **Grothaus et al.** Vaccine, 2000, vol. 18, 1253-1263 [0217]
- **Kanra et al.** The Turkish Journal of Paediatrics, 1999, vol. 42, 421-427 [0217]
- **Ravenscroft et al.** Dev Biol (Basel), 2000, vol. 103, 35-47 [0217]
- **Watson.** Pediatr Infect Dis J, 2000, vol. 19, 331-332 [0217]
- **Rubin.** Pediatr Clin North Am, 2000, vol. 47, 269-285v [0217]
- **Jedrzejak.** Microbiol Mol Biol Rev, 2001, vol. 65, 187-207 [0217]
- **Zielen et al.** Infect. Immun., 2000, vol. 68, 1435-1440 [0217]

- **Tettelin et al.** *Science*, 2001, vol. 293, 498-506 [0217]
- **Hoskins et al.** *J Bacteriol*, 2001, vol. 183, 5709-5717 [0217]
- **Rappuoli.** *Curr Opin Microbiol*, 2000, vol. 3, 445-450 [0217]
- **Rappuoli.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 2688-2691 [0217]
- **Masignani et al.** *Expert Opin Biol Ther*, 2002, vol. 2, 895-905 [0217]
- **Mora et al.** *Drug Discov Today*, 2003, vol. 8, 459-464 [0217]
- **Wizemann et al.** *Infect Immun*, 2001, vol. 69, 1593-1598 [0217]
- **Rigden et al.** *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2003, vol. 38, 143-168 [0217]
- **Paoletti et al.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 2118-2126 [0217]
- **Gennaro.** *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 2000 [0217]
- *Vaccine Design*. Plenum, 1995 [0217]
- **Barr et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, vol. 32, 247-271 [0217]
- **Sjolander et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, vol. 32, 321-338 [0217]
- **Niikura et al.** *Virology*, 2002, vol. 293, 273-280 [0217]
- **Lenz et al.** *J Immunol*, 2001, vol. 166, 5346-5355 [0217]
- **Pinto et al.** *J Infect Dis*, 2003, vol. 188, 327-338 [0217]
- **Gerber et al.** *Virology*, 2001, vol. 75, 4752-4760 [0217]
- **Gluck et al.** *Vaccine*, 2002, vol. 20, B10-B16 [0217]
- **Johnson et al.** *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, vol. 9, 2273-2278 [0217]

- **Evans et al.** *Expert Rev Vaccines*, 2003, vol. 2, 219-229 [0217]
- **Meraldi et al.** *Vaccine*, 2003, vol. 21, 2485-2491 [0217]
- **Pajak et al.** *Vaccine*, 2003, vol. 21, 836-842 [0217]
- **Kandimalla et al.** *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, 2393-2400 [0217]
- **Krieg.** *Nature Medicine*, 2003, vol. 9, 831-835 [0217]
- **McCluskie et al.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2002, vol. 32, 179-185 [0217]
- **Kandimalla et al.** *Biochemical Society Transactions*, 2003, vol. 31, 654-658 [0217]
- **Blackwell et al.** *J Immunol*, 2003, vol. 170, 4061-4068 [0217]
- **Krieg.** *Trends Immunol*, 2002, vol. 23, 64-65 [0217]
- **Kandimalla et al.** *BBRC*, 2003, vol. 306, 948-953 [0217]
- **Bhagat et al.** *BBRC*, 2003, vol. 300, 853-861 [0217]
- **Beignon et al.** *Infect Immun*, 2002, vol. 70, 3012-3019 [0217]
- **Pizza et al.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 2534-2541 [0217]
- **Pizza et al.** *Int J Med Microbiol*, 2000, vol. 290, 455-461 [0217]
- **Scharton-Kersten et al.** *Infect Immun*, 2000, vol. 68, 5306-5313 [0217]
- **Ryan et al.** *Infect Immun*, 1999, vol. 67, 6270-6280 [0217]
- **Partidos et al.** *Immunol Lett*, 1999, vol. 67, 209-216 [0217]
- **Peppoloni et al.** *Expert Rev Vaccines*, 2003, vol. 2, 285-293 [0217]
- **Pine et al.** *J Control Release*, 2002, vol. 85, 263-270 [0217]
- **Domenighini et al.** *Mol Microbiol*, 1995, vol. 15, 1165-1167 [0217]

- **Singh et al.** *J Cont Release*, 2001, vol. 70, 267-276 [0217]
- **Andrianov et al.** *Biomaterials*, 1998, vol. 19, 109-115 [0217]
- **Payne et al.** *Adv Drug Delivery Review*, 1998, vol. 31, 185-196 [0217]
- **Stanley.** *Clin Exp Dermatol*, 2002, vol. 27, 571-577 [0217]
- **Jones.** *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, vol. 4, 214-218 [0217]
- **Almeida; Alpar.** *J. Drug Targeting*, 1996, vol. 3, 455-467 [0217]
- **Agarwal; Mishra.** *Indian J Exp Biol*, 1999, vol. 37, 6-16 [0217]
- **Jakobsen et al.** *Infect Immun*, 2002, vol. 70, 1443-1452 [0217]
- **Wu et al.** *J Infect Dis*, 1997, vol. 175, 839-846 [0217]
- **Bergquist et al.** *APMIS*, 1998, vol. 106, 800-806 [0217]
- **Baudner et al.** *Infect Immun*, 2002, vol. 70, 4785-4790 [0217]
- **Ugozzoli et al.** *J Infect Dis*, 2002, vol. 186, 1358-1361 [0217]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. 1987 [0217]
- **Smith; Waterman.** *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482-489 [0217]

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição imunogénica aquosa que, depois da administração a um indivíduo, pode induzir uma resposta imune que é (a) bactericida contra pelo menos o serogrupo W135 de *N. meningitidis* e (b) protectora contra doença por *H. influenzae* de tipo b, em que a composição compreende:

(i) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo W135; e

(ii) um antigénio sacarídeo capsular conjugado de *H. influenzae* de tipo b ('Hib');

e em que o sacárido do serogrupo W135 está conjugado com um toxóide diftérico.

2. Uma composição imunogénica aquosa que, depois da administração a um indivíduo, pode induzir uma resposta imune que é (a) bactericida contra pelo menos o serogrupo W135 de *N. meningitidis* e (b) protectora contra doença por *H. influenzae* de tipo b, em que a composição compreende:

(i) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo W135; e

(ii) um antigénio sacarídeo capsular Hib conjugado;

e em que o sacárido do serogrupo W135 está conjugado com um toxóide tetânico.

3. Uma composição imunogénica aquosa que, depois da administração a um indivíduo, pode induzir uma resposta imune que é (a) bactericida contra pelo menos o serogrupo W135 de *N. meningitidis* e (b) protectora contra doença por *H. influenzae* de tipo b, em que a composição compreende:

(i) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo W135; e

(ii) um antigénio sacarídeo capsular Hib conjugado;

e em que o sacárido do serogrupo W135 está conjugado com uma proteína D de *H. influenzae*.

4. Uma composição imunogénica aquosa que, depois da administração a um indivíduo, pode induzir uma resposta imune que é (a) bactericida contra pelo menos o serogrupo W135 de *N. meningitidis* e (b) protectora contra doença por *H. influenzae* de tipo b, em que a composição compreende:

(i) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo W135; e

(ii) um antigénio sacarídeo capsular Hib conjugado;

e em que o sacárido Hib está conjugado com um toxóide tetânico.

5. Uma composição imunogénica aquosa que, depois da administração a um indivíduo, pode induzir uma resposta imune que é (a) bactericida contra pelo menos o serogrupo W135 de *N. meningitidis* e (b) protectora contra doença por *H. influenzae* de tipo b, em que a composição compreende:

(i) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo W135; e

(ii) um antigénio sacarídeo capsular Hib conjugado;

e em que a composição inclui um adjuvante de fosfato de alumínio.

6. Uma composição imunogénica aquosa que, depois da administração a um indivíduo, pode induzir uma resposta imune que é (a) bactericida contra pelo menos o serogrupo W135 de *N. meningitidis* e (b) protectora contra doença por *H. influenzae* de tipo b, em que a composição compreende:

(i) um antigénio sacarídeo capsular conjugado do serogrupo W135; e

(ii) um antigénio sacarídeo capsular Hib conjugado;

e em que o sacárido do serogrupo W135 está conjugado com um mutante da toxina diftérica, o CRM₁₉₇, e a composição compreende ≤ 30 μg de sacárido meningocócico por dose.

7. A composição de qualquer reivindicação anterior que compreende além disso antigénios sacarídeos capsulares conjugados dos serogrupos C e Y e, opcionalmente, A.

8. A composição de qualquer reivindicação anterior que compreende, além disso, um ou mais antigénios polipeptídicos do serogrupo B de *N. meningitidis*.

9. A composição de qualquer uma das reivindicações 1-7, em que a composição consiste essencialmente em (i), (ii) e antigénios sacarídeos capsulares conjugados dos serogrupos C e Y e, opcionalmente, A.

10. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que o sacárido do serogrupo W135 tem um grau de polimerização inferior a 30.

11. A composição de qualquer reivindicação anterior quando dependente da reivindicação 4 ou da reivindicação 5, em que o sacárido do serogrupo W135 está conjugado com um toxóide diftérico, um toxóide tetânico ou um mutante da toxina diftérica, o CRM₁₉₇.

12. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que a mesma proteína transportadora é utilizada para todos os serogrupos.

13. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que o sacárido do serogrupo W135 tem uma relação de sacárido:proteína (peso/peso) entre 1:5 e 5:1.
14. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que o sacárido do serogrupo W135 está conjugado por meio de um *linker*.
15. A composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que o sacárido do serogrupo W135 está conjugado directamente.
16. A composição de qualquer reivindicação anterior quando dependente de uma das reivindicações 1-3 ou 5-6, em que o sacárido Hib está conjugado com mutante da toxina diftérica, o CRM₁₉₇, um toxóide tetânico ou um complexo da membrana externa de *N. meningitidis*.
17. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que a composição compreende um adjuvante.
18. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que a composição não inclui um adjuvante de hidróxido de alumínio.
19. A composição de qualquer reivindicação anterior quando dependente de uma das reivindicações 1-4 ou 6, em que a composição inclui um adjuvante de fosfato de alumínio.
20. A composição da reivindicação 5 ou 19, em que o antigénio Hib está adsorvido a fosfato de alumínio.

21. A composição da reivindicação 5 ou 19, em que o antigénio Hib não está adsorvido a fosfato de alumínio.

22. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que o antigénio Hib é inicialmente liofilizado.

23. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que a administração do antigénio Hib produz uma concentração de anticorpo anti-fosfato de polirribosilribitol de $\geq 0,15$ $\mu\text{g/ml}$.

24. A composição de qualquer reivindicação anterior, em que os conjugados têm uma relação de sacárido:proteína (peso/peso) de entre 1:5 e 5:1.