

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

(22) Data de pedido: **1998.09.29**

(30) Prioridade(s): **1997.10.02 US 942852**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.07.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.01.25**  
**081/2012**

(73) Titular(es):

**CONNAUGHT LABORATORIES INCORPORATED**  
**ROUTE 611, P.O.BOX 187 SWIFTWATER**  
**PENNSYLVANIA 18370-0187** **US**

(72) Inventor(es):

**ROBERT P. RYALL** **US**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA A LIGAÇÃO COVALENTE DE POLISSACÁRIDOS A MOLÉCULAS DE PROTEÍNA**

(57) Resumo:

SÃO AQUI DIVULGADOS E REIVINDICADOS UM MÉTODO PARA A LIGAÇÃO COVALENTE DE POLI- E OLIGOSSACÁRIDOS A MOLÉCULAS DE PROTEÍNA ATRAVÉS DE DESPOLIMERIZAÇÃO POR PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO DAS UNIDADES POLISSACARÍDICAS, SEGUIDA POR LIGAÇÃO DA CADEIA POLISSACARÍDICA DESPOLIMERIZADA AOS GRUPOS AMINOÁCIDO DE UMA PROTEÍNA DE INTERESSE ATRAVÉS DE UMA MOLÉCULA LIGANTE, PRODUTOS ORIGINÁRIOS DO MESMO, E MÉTODOS PARA UTILIZAÇÃO DOS PRODUTOS.

RESUMO

**"Método para a ligação covalente de polissacáridos a moléculas de proteína"**

São aqui divulgados e reivindicados um método para a ligação covalente de poli- e oligossacáridos a moléculas de proteína através de despolimerização por peróxido de hidrogénio das unidades polissacarídicas, seguida por ligação da cadeia polissacarídica despolimerizada aos grupos aminoácido de uma proteína de interesse através de uma molécula ligante, produtos originários do mesmo, e métodos para utilização dos produtos.

## DESCRIÇÃO

### **"Método para a ligação covalente de polissacáridos a moléculas de proteína"**

#### **CAMPO DO INVENTO**

O presente invento refere-se a um método para a ligação covalente de poli- e oligossacáridos a moléculas de proteína através de despolimerização por peróxido de hidrogénio das unidades polissacarídicas, seguida por ligação da cadeia polissacarídica despolimerizada aos grupos aminoácido de uma proteína de interesse através de uma molécula ligante.

Neste pedido de patente são referenciadas várias publicações. A citação completa destas publicações é encontrada onde estas são citadas ou no final do fascículo, imediatamente precedendo as reivindicações. Estas publicações referem-se ao estado da técnica à qual o invento pertence; no entanto, não existe qualquer admissão de que estas publicações sejam de facto especialidade anterior.

#### **ANTERIORIDADE DO INVENTO**

Em anos recentes, tem-se verificado um considerável interesse no desenvolvimento de abordagens para ligar covalentemente poli- e oligossacáridos a moléculas de proteína. Esta abordagem tem sido aplicada na área do desenvolvimento de vacinas, onde polissacáridos capsulares bacterianos purificados têm sido ligados covalentemente a moléculas de proteína (Dick, W.E. *et al.*, 1989). Estas construções foram denominadas vacinas conjugadas.

A razão para a preparação destas construções é que polissacáridos capsulares bacterianos purificados, que são classificados como antigénios independentes de células T, podem ser convertidos em antigénios semelhantes a células T por ligação covalente a certas moléculas de proteína. As vacinas de polissacárido não conjugadas não são capazes de induzir uma resposta anamnésica no ser humano, e a resposta imunitária a estes antigénios pode ser de duração limitada, especialmente em populações mais jovens. Por esta razão, as

vacinas de polissacárido não têm sido recomendadas para utilização em populações infantis, por causa da sua eficácia limitada inerente nesta população.

Ao logo dos últimos dez a quinze anos, polissacárido capsular purificado a partir de *Haemophilus influenzae* tipo b tem sido ligado covalentemente a várias moléculas de proteína, e.g. proteína toxóide da difteria e toxóide do tétano, e estes conjugados são conhecidos por induzirem uma resposta imunitária dependente de células T na população infantil. Esta particularidade tem permitido o desenvolvimento e licenciamento de vacinas eficazes contra doença causada pela bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Santosham, M., 1993). Esta abordagem à preparação de vacinas conjugadas tem também sido alargada a outros polissacáridos capsulares, tais como os purificados a partir de *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*.

#### **OBJECTOS E SUMÁRIO DO INVENTO**

Uma via geral que tem sido utilizada para preparar estes conjugados sacárido-proteína é activar um ou mais locais sobre a cadeia sacarídica de modo que estes locais activados reagirão com um ou mais dos grupos aminoácido da proteína.

No desenvolvimento de uma estratégia para ligar covalentemente polissacáridos a proteínas, é aqui descrita uma via onde a cadeia polissacarídica é inicialmente despolimerizada até oligossacáridos de peso molecular médio na gama de 10-30 000 e.g., 10-25 000 daltons. Duas vantagens para se utilizarem polissacáridos despolimerizados para preparar os conjugados são: (a) os conjugados preparados a partir da utilização de polissacáridos despolimerizados podem ser inerentemente mais imunogénicos do que os conjugados correspondentes preparados a partir de polissacáridos a todo o comprimento; e (b) reacções utilizadas para preparar estas vacinas conjugadas podem oferecer um grau de controlo mais elevado, bem como mais versatilidade no desenho do processo, quando se utilizam cadeias polissacarídicas despolimerizadas *versus* cadeias polissacarídicas a todo o comprimento.

Nalguns casos, podem-se ligar covalentemente as cadeias polissacarídicas despolimerizadas por adição de um reagente específico que permite a formação de uma ligação entre o polissacárido e as moléculas de proteína. Dependendo da química que é utilizada para realizar esta operação, podem-se formar uma ou mais ligações entre o polissacárido e a proteína. Noutros casos, tem sido utilizada uma via alternativa pela qual uma pequena molécula química é ligada quer ao polissacárido despolimerizado quer à molécula de proteína, e esta molécula, por causa da sua reactividade inerente, serve como uma molécula ligante entre o polissacárido e a proteína. Estas moléculas têm sido denominadas ligantes químicos, ligante e/ou ligante directo.

O método do presente invento utiliza preferivelmente a última abordagem, pela qual uma molécula ligante é ligada à cadeia polissacarídica que proporciona ligação selectiva a grupos aminoácido de proteínas. Neste processo, os polissacáridos são primeiro despolimerizados utilizando peróxido de hidrogénio sob condições hidrolíticas moderadas. A reacção de hidrólise é um processo bem controlado que produz uma distribuição uniforme de cadeias de oligossacárido que prontamente reagem com uma hidrazida e/ou uma amina. O grau com o qual a hidrazida ou amina podem ser ligadas aos polissacáridos hidrolisados por peróxido de hidrogénio pode ser aumentado por adição de um composto reagente de carbodi-imida solúvel em água.

A razão para esta característica é que uma certa população das cadeias polissacarídicas despolimerizadas possui um grupo químico que pode ser prontamente derivatizado com hidrazida ou amina pela adição de carbodi-imidas solúveis em água ao meio reaccional. Estas cadeias polissacarídicas derivatizadas com hidrazida/amina resultantes podem depois ser ligadas selectivamente a grupos ácido carboxílico de proteína.

Deste modo, num primeiro aspecto, o presente invento proporciona um método para preparação de uma construção compreendendo um polissacárido e/ou oligossacárido ligados covalentemente a uma molécula de proteína, o referido método compreendendo despolimerização do referido polissacárido e/ou

oligossacárido utilizando peróxido de hidrogénio sob condições hidrolíticas moderadas, gerando desse modo um grupo ácido carboxílico, onde as referidas condições moderadas são uma temperatura de 30°C a 80°C e um pH de 4,5 a 8,0 ± 0,10; derivatização do polissacárido e/ou oligossacárido despolimerizado com uma molécula seleccionada entre o grupo consistindo em uma amina e uma hidrazida, onde a derivatização é realizada na presença de uma carbodi-imida; e conjugação do referido polissacárido e/ou oligossacárido despolimerizado derivatizado com grupos ácido carboxílico de uma molécula de proteína.

Num segundo aspecto, o presente invento proporciona uma construção preparada de acordo com o método do primeiro aspecto.

Um terceiro aspecto do presente invento refere-se a uma composição imunológica, imunogénica ou terapêutica compreendendo a construção de acordo com o segundo aspecto, onde a construção compreende uma porção seleccionada entre o grupo consistindo em um epítipo de interesse, um modulador da resposta biológica e um factor de crescimento, e um transportador ou diluente farmacologicamente aceitável, onde a proteína da referida construção é capaz de induzir uma resposta imunitária dependente de células T num hospedeiro injectado com a referida proteína.

Num quarto aspecto, o presente invento proporciona uma vacina compreendendo a composição imunológica do terceiro aspecto.

Um quinto aspecto do presente invento refere-se a uma construção de acordo com o segundo aspecto para indução de uma resposta imunológica num vertebrado, onde a construção compreende uma porção seleccionada entre o grupo consistindo em um epítipo de interesse, um modulador da resposta biológica e um factor de crescimento.

Num sexto aspecto, o presente invento proporciona uma construção de acordo com o segundo aspecto para tratamento de um vertebrado necessitado de tratamento, onde a construção compreende uma porção seleccionada entre o grupo consistindo

em um epítopo de interesse, um modulador da resposta biológica e um factor de crescimento.

Concretizações preferidas dos aspectos do presente invento são apresentadas nas reivindicações 2 a 12.

Assim, o método do presente invento proporciona um processo pelo qual polissacáridos podem ser degradados ou despolimerizados de modo controlável sob condições hidrolíticas moderadas, *i.e.*, utilizando baixas concentrações de peróxido de hidrogénio a temperaturas ligeiramente elevadas e em condições ligeiramente ácidas, básicas ou neutras, *i.e.* temperaturas na gama de 30-80°C e valores de pH na gama de 4,5-8,0 ± 0,10.

Este processo foi surpreendentemente adaptado a partir da degradação de moléculas de carboidrato por peróxido de hidrogénio alcalino sob várias condições de reacção (Isbell, H.S. *et al.*, 1987). Este processo de despolimerização parece decorrer por um ataque aleatório a ligações glicosídicas pelo peróxido de hidrogénio, produzindo por isso uma distribuição de peso molecular uniforme de cadeias de carboidrato despolimerizadas.

Historicamente, os polissacáridos têm sido despolimerizados por uma variedade de abordagens que incluem aquecimento sob condições ácidas, básicas ou neutras, irradiação ultra-sónica, força de atrito, clivagens catalisadas por enzimas, mediadas por radicais, catalisadas por ião metálico e oxidação de periodato onde aplicável (Yalpani, M., 1988). A capacidade de qualquer um destes métodos para despolimerizar uma cadeia polissacarídica particular é ditada pela constituição física da cadeia polissacarídica. A previsão das melhores condições hidrolíticas é, por vezes, difícil mesmo quando se conhece a estrutura da unidade de repetição de polissacárido.

No entanto, em contraste inesperado com as abordagens históricas à despolimerização de polissacáridos, o método de o presente invento foi aplicado a vários polissacáridos estruturalmente dissimilares.

A definição das condições para obter a distribuição de peso molecular desejada é um processo relativamente simples, porque o único parâmetro experimental muito influente no processo do invento é a temperatura. Os outros parâmetros experimentais que permitem ajustamentos finos da distribuição de peso molecular são a percentagem de peróxido de hidrogénio utilizada na mistura reaccional e o intervalo de tempo da reacção.

Têm sido propostos vários mecanismos para a degradação alcalina de carboidratos utilizando peróxido de hidrogénio (Isbell, H.S. *et al.*, 1987). A clivagem das cadeias parece ocorrer selectivamente na ligação glicosídica. O açúcar terminal redutor assim gerado, ou permanece no seu estado de oxidação nativo (*i.e.* aldeído), ou pode sofrer oxidação para o estado de oxidação mais elevado seguinte (*i.e.* ácido carboxílico). A forma de aldeído é muito mais reactiva em relação a hidrazidas do que os grupos açúcar terminais redutores normais gerados por hidrólise ácida ou básica, o que sugere que o açúcar terminal redutor pode existir numa forma aberta e não como um hemiacetal.

De acordo com o mecanismo proposto por Isbell (1987), o açúcar terminal redutor pode sofrer degradação limitada nestas reacções para produzir uma unidade alditol mais pequena, deixando por isso o açúcar terminal redutor na forma aberta. Os dados disponíveis suportam a afirmação de que as cadeias geradas por despolimerização por peróxido de hidrogénio são muito mais reactivas em relação a hidrazidas do que as cadeias que são despolimerizadas quer por ácido quer por base.

Existem também cadeias polissacarídicas despolimerizadas que contêm grupos que são reactivos com carbodi-imidas solúveis em água, que permitem a derivatização adicional com compostos contendo quer amina quer hidrazida. Podem-se derivatizar ambos os grupos polissacárido na mesma reacção adicionando o composto de carbodi-imida solúvel em água ao meio reaccional.

A construção pode ser obtida a partir de um polissacárido capsular bacteriano despolimerizado

derivatizado seleccionado entre o grupo consistindo em *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F e *Neisseria meningitidis* grupos A, C, W135 e Y.

O peso molecular médio do poli/oligossacárido despolimerizado pode ser 10-30 000 daltons, e.g., 10-25 000 daltons.

O invento compreende adicionalmente a construção ou composição compreendendo a construção para obtenção de uma resposta imunológica ou imunitária ou para tratamento ou terapia, por exemplo por administração da construção ou composição compreendendo a construção a um animal ou humano.

Estes e outros objectivos e concretizações são divulgados ou são óbvios a partir da, e são abrangidos pela, descrição detalhada seguinte.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1A mostra o perfil SEC S-2000 do polissacárido Pn 19F despolimerizado;

A Figura 1B mostra o cromatograma SEC S-200 para o polissacárido Pn 19F despolimerizado, onde o traçado superior segue o índice de refracção do eluente da amostra e o traçado inferior segue a absorvância UV a 254 nm;

A Figura 1C mostra o perfil cinético para a despolimerização de polissacáridos por peróxido de hidrogénio;

A Figura 2A mostra a reacção de dextrano despolimerizado por peróxido de hidrogénio com di-hidrazida adípica, com seguimento por UV a 300 e 210 nm ao longo do tempo;

A Figura 2B mostra a reacção de polissacárido 19F pneumocócico despolimerizado por peróxido de hidrogénio com di-hidrazida de ácido adípico, com seguimento por UV de 310 a 210 nm ao longo do tempo;

As Figuras 3A e 3B mostram a hidrazona formada a partir da reacção de hidrazida de ácido acético e glutaraldeído e de hidrazida de ácido acético e gliceraldeído, respectivamente, onde o varrimento UV é de 320 a 220 nm; e

As Figuras 4A-C mostram o perfil SEC S-200 de polissacárido Pn6B despolimerizado e derivatizado, respectivamente.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO**

O processo inventivo foi aplicado a vários polissacáridos capsulares bacterianos distintamente diferentes, bem como a polissacáridos de dextrano disponíveis comercialmente, ainda que não seja necessário que o processo esteja limitado apenas a estes polissacáridos. Os polissacáridos capsulares bacterianos que foram despolimerizados e derivatizados com compostos contendo hidrazida por este processo incluem *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, e *Neisseria meningitidis* grupos A, C, W135 e Y.

De acordo com o método do presente invento, os polissacáridos são primeiro dissolvidos em qualquer dos tampões Tris-HCl, citrato, acetato ou fosfato (numa concentração de tampão 50-100 mM), as soluções são aquecidas a 30-80°C e o pH é ajustado numa gama entre 4,5-8,0 ± 0,1. A adição de peróxido de hidrogénio é efectuada após a solução ter atingido a temperatura desejada, e esta adição é considerada como o tempo zero. Após o tempo de aquecimento desejado estar completo, o material despolimerizado é arrefecido até à temperatura ambiente. Este passo serve para parar a reacção hidrolítica. O peróxido de hidrogénio não reagido pode ser neutralizado quer por adição de um agente de redução, tal como bissulfito de sódio, quer por meios de remoção físicos, e.g., diálise ou ultrafiltração.

As determinações de peso molecular são efectuadas por eluição através de uma coluna de exclusão de tamanhos que é calibrada utilizando padrões de dextrano disponíveis comercialmente. O número de grupos terminais redutores pode ser determinado utilizando o método de Park Johnson (Park,

J.T. *et al.*, 1949). A recuperação de polissacárido é determinada por ensaio de um ou mais dos açúcares componentes presentes na unidade de repetição de polissacárido.

A cinética da reacção de despolimerização segue uma relação linear representando graficamente o log do peso molecular médio (MW) do polissacárido despolimerizado *versus* o tempo que a amostra é aquecida (tempo de reacção). Utilizando uma série de colunas de exclusão de tamanhos, constatou-se que esta linearidade se estende na gama de MW de 10 000 a 500 000 daltons. Em geral, a temperatura da reacção de despolimerização e a quantidade de peróxido utilizada na reacção de despolimerização servem como ajustamentos grosseiros para a velocidade de despolimerização, *i.e.*, quanto mais elevada a temperatura, ou quanto mais elevada a concentração de peróxido, mais rápida a reacção.

O tempo de aquecimento, ou tempo de reacção, permite ajustamentos finos para conseguir o peso molecular médio desejado para o polissacárido despolimerizado. A concentração de polissacárido na gama de 1 a 8 mg de polissacárido/ml de volume reaccional não parece influenciar o resultado da despolimerização. O pH da despolimerização foi feito variar na gama entre 5 e 8. Sob certas condições de reacção, onde apenas se faz variar o pH da mistura, a extensão da despolimerização a pH 7 ou 8 é essencialmente a mesma, porém, a velocidade da reacção é mais lenta a pH abaixo de 7.

A citação "amina" como aqui utilizada refere-se a um composto da fórmula  $R^1NR^2R^3$ , onde  $R^1$  é  $C_1$  a  $C_{20}$  (*e.g.*,  $C_1$ - $C_{12}$ , tal como  $C_1$ - $C_8$ ) alquilo de cadeia linear ou ramificada, alcenilo de cadeia linear ou ramificada, alcinilo, cicloalquilo de cadeia linear ou ramificada e aromático não substituído ou substituído (*e.g.*, fenilo, naftilo e fenantrilo),  $R^2$  e  $R^3$ , independentemente um do outro, são hidrogénio,  $C_1$  a  $C_{20}$  (*e.g.*,  $C_1$ - $C_{12}$ , tal como  $C_1$ - $C_8$ ) alquilo de cadeia linear ou ramificada, alcenilo de cadeia linear ou ramificada, alcinilo de cadeia linear ou ramificada, cicloalquilo de cadeia linear ou ramificada e aromático não substituído ou substituído (*e.g.*, fenilo, naftilo e fenantrilo), onde o  $C_1$  a  $C_{20}$  (*e.g.*,  $C_1$ - $C_{12}$ , tal como  $C_1$ - $C_8$ ) alquilo de cadeia linear ou ramificada, alcenilo de cadeia

linear ou ramificada, alcinilo de cadeia linear ou ramificada, cicloalquilo de cadeia linear ou ramificada e aromático não substituído ou substituído (e.g., fenilo, naftilo e fenantrilo) pode estar substituídos com  $NR^2R^3$ , onde  $R^2$  e  $R^3$  são como definidos acima.

Além disso, a citação do termo "hidrazida" refere-se a um composto da fórmula  $NH_2NR^1R^2$ , onde  $R^1$  e  $R^2$ , independentemente um do outro, são hidrogénio,  $C_1$  a  $C_{20}$  (e.g.,  $C_1$ - $C_{12}$ , tal como  $C_1$ - $C_8$ ) alquilo de cadeia linear ou ramificada, alcenilo de cadeia linear ou ramificada, alcinilo de cadeia linear ou ramificada, cicloalquilo de cadeia linear ou ramificada, aromático não substituído ou substituído (e.g., fenilo, naftilo e fenantrilo) e carbonilo, onde o  $C_1$  a  $C_{20}$  (e.g.,  $C_1$ - $C_{12}$ , tal como  $C_1$ - $C_8$ ) alquilo de cadeia linear ou ramificada, alcenilo de cadeia linear ou ramificada, alcinilo de cadeia linear ou ramificada, cicloalquilo de cadeia linear ou ramificada e aromático não substituído ou substituído (e.g., fenilo, naftilo e fenantrilo) podem estar substituídos com  $NR^1R^2NH_2$ , onde  $R^1$  e  $R^2$  são como definidos acima. Numa concretização preferida, a hidrazida é  $NH_2NR^1C(O)R^2C(O)NR^3NH_2$ , e  $R^1$ ,  $R^2$  e  $R^3$  são como definidos acima.

A reacção de despolimerização produz uma distribuição média simétrica de cadeias de peso molecular, como se mostra na Figura 1. Todas as cadeias na reacção de despolimerização sofrem hidrólise, como determinado por ensaio quanto à presença de carboidrato no eluído da coluna de exclusão de tamanhos, e a extensão da despolimerização é governada pelas variáveis experimentais aqui descritas. As recuperações de polissacárido a partir da reacção de despolimerização são quase quantitativas, o que sugere que a reacção prossegue por uma clivagem aleatória de ligações glicosídicas em vez de ser um processo de degradação de grupos terminais.

As cadeias polissacarídicas hidrolisadas são bastante reactivas em relação a amins e hidrazidas. Isto parece ser uma propriedade única do processo do invento, porque quando o mesmo polissacárido é despolimerizado por ácido ou base, o polissacárido despolimerizado resultante ou é não reactivo ou reage de modo relativamente lento com amins e hidrazidas.

A base de Schiff que se forma a partir da reacção das aminas com os polissacáridos despolimerizados pode ser estabilizada por redução utilizando cianoboro-hidreto de sódio. As hidrazonas formadas a partir da reacção dos polissacáridos despolimerizados com hidrazidas são inerentemente muito mais estáveis do que as bases de Schiff geradas por amina formadas por reacção dos polissacáridos despolimerizados com uma amina. As hidrazonas formadas a partir dos polissacáridos despolimerizados com hidrazida podem também ser adicionalmente estabilizadas por redução utilizando quaisquer condições de redução apropriadas, *e.g.*, cianoboro-hidreto de sódio. As reacções quer com aminas quer com hidrazidas são relativamente rápidas sob as condições apropriadas. A derivatização das cadeias despolimerizadas pode ser conseguida dentro de um intervalo de tempo de vários minutos a 1 a 2 horas, por agitação da mistura reaccional à temperatura ambiente entre pH 5 e 8, num meio aquoso. Estas reacções podem ser visualizadas por seguimento do aumento em absorvância a 237 nm, como se mostra na Figura 2. Esta absorvância parece ser devida à formação de hidrazona, porque o seu  $\lambda_{\text{máx}}$  é aproximadamente o mesmo que o  $\lambda_{\text{máx}}$  observado para a hidrazona formada a partir da reacção de di-hidrazida adípica com glutaraldeído e gliceraldeído, como se mostra nas Figuras 3A e 3B.

Adicionalmente, parecem existir dois grupos reactivos diferentes que são produzidos como resultado da reacção de despolimerização. Como aqui referido, um grupo parece ser um aldeído reactivo, com base nas observações seguintes: as cadeias polissacarídicas despolimerizadas possuem actividade redutora quando ensaiadas pelo método de Park Johnson (Park, J.T., *et al.*, 1949). A actividade redutora pode ser eliminada quando as cadeias polissacarídicas despolimerizadas são tratadas com boro-hidreto de sódio, e as cadeias polissacarídicas despolimerizadas mostram reactividade com reagentes conhecidos por reagirem com aldeídos, tais como hidrazidas.

O segundo grupo que é gerado a partir destas reacções de despolimerização parece ser um grupo ácido carboxílico. Os grupos ácido carboxílico parecem resultar da oxidação dos grupos aldeído terminais durante o curso da reacção de

despolimerização, o que está de acordo com os mecanismos de reacção que têm sido propostos (aqui descritos).

A existência do grupo ácido carboxílico foi demonstrada como se segue: quando o polissacárido despolimerizado, tal como dextrano T-2000 ou polissacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* tipo 14, que são ambos neutros, e nenhum dos quais contém um grupo ácido carboxílico nativo, é primeiro reduzido com boro-hidreto de sódio, na extensão em que toda a actividade redutora associada com o polissacárido é eliminada, então este polissacárido reduzido deixa de ser reactivo em relação a hidrazidas quando se misturam os dois sob condições que normalmente conduzem a reacção; no entanto, quando se inclui 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodi-imida (EDAC) na mesma mistura reaccional, a hidrazida é incorporada nas cadeias polissacarídicas despolimerizadas reduzidas. Cadeias polissacarídicas despolimerizadas não reduzidas, que são misturadas com compostos de hidrazida tais como di-hidrazida adípica ou 1,6-diamino-hexano, conduzirão a reacção, pelo que as hidrazidas produzem ligações hidrazona estáveis aos polissacáridos despolimerizados, e as amins reagem para formar ligações de base de Schiff instáveis aos polissacáridos despolimerizados. Tanto as bases de Schiff como as hidrazonas podem ser estabilizadas por redução utilizando quaisquer condições de redução apropriadas, e.g. cianoboro-hidreto de sódio. Quando se inclui EDAC nesta última reacção, o nível de hidrazida que é incorporado nas cadeias polissacarídicas é maior do que quando a reacção é realizada sem EDAC.

Esta série de resultados sugere que, durante o curso da despolimerização, as cadeias são primeiro clivadas de um modo aleatório na ligação glicosídica o que produz um resíduo açúcar terminal redutor. O açúcar terminal redutor ou contém um grupo aldeído, ou em alguns casos este grupo aldeído sofre oxidação adicional num grupo ácido carboxílico. O nível de derivatização é consistente com cada cadeia ficar derivatizada com uma hidrazida reactiva ou com uma amina reactiva, dependendo do co-reagente utilizado. O nível teórico de incorporação de hidrazida ou amina pode ser determinado a partir do peso molecular do polissacárido despolimerizado tomando o recíproco do peso molecular médio,

e.g. se o peso molecular médio de um dado polissacárido despolimerizado é 10 000, então o nível máximo teórico de derivatização para cada miligrama de polissacárido é 100 nmol, assumindo um local reactivo por cadeia.

A Tabela 1 proporciona uma lista de vários polissacáridos despolimerizados, em conjunto com os seus pesos moleculares médios, o nível teórico de derivatização com hidrazida, e o nível observado de derivatização. Adicionalmente, a Figura 4A é um cromatograma de filtração em gel de um polissacárido despolimerizado. A Figura 4B é um segundo cromatograma de filtração em gel do mesmo polissacárido após derivatização com di-hidrazida adípica. Como se mostra na Figura 3B, a distribuição de hidrazida sobrepõe-se com a distribuição de pesos moleculares para o polissacárido. Para além disso, existe uma relação linear no que se refere ao nível de derivatização com o peso molecular do polissacárido, como se mostra na Figura 4C, como seria de esperar com um único local de derivatização por cadeia em oposição a um local de derivatização aleatório.

Tabela 1. Sumário do nível de derivatização com hidrazida para polissacáridos despolimerizados por peróxido de hidrogénio.

Tipo de Ps	Lote de Ps	MW por SEC	nmol de AH por mg	MW por grupo final	Razão $\frac{\text{MW}_{\text{sec}}}{\text{MW}_{\text{e.g.}}}$
Pn3	D01305	19 000	82	12 200	1,56
Pn4	D01306	17 000	109	9 200	1,85
Pn6B	D01300	17 400	103	9 700	1,79
Pn9V	D01304	17 000	90	11 100	1,53
Pn14	D01302	17 900	64	15 600	1,15
Pn18C	D01038	18 000	82	12 200	1,48
Pn19F	D01299	15 900	90	11 100	1,43
Pn23F	D01310	13 900	125	8 000	1,74
MenA	D01270	19 300	97	10 300	1,87
MenC	D01741	19 100	55	18 200	1,05

Como aqui afirmado, o processo do invento para derivatização utiliza uma molécula pequena, e.g. di-hidrazida

adípica ou 1,6-diamino-hexano, que é ligada covalentemente ao polissacárido despolimerizado por peróxido de hidrogénio. Estas moléculas pequenas são ligadas ao polissacárido despolimerizado por uma de duas ligações ou elementos de ligação distintos. No caso de di-hidrazida adípica, pensa-se que a ligação que liga a molécula pequena ao polissacárido despolimerizado é um elemento de ligação de hidrazida, que resulta da redução por cianoboro-hidreto de sódio do elemento de ligação hidrazona inicial, e um elemento de ligação de hidrazida de ácido, que resulta da reacção da di-hidrazida adípica que reage com o ácido carboxílico putativo activado por EDAC. No caso de 1,6-diamino-hexano, pensa-se que a ligação é um elemento de ligação amina, que resulta da redução por cianoboro-hidreto de sódio da base de Schiff, e um elemento de ligação amida, que resulta da reacção de 1,6-diamino-hexano com o ácido carboxílico putativo activado por EDAC. Estes polissacáridos derivatizados são capazes de reagirem prontamente de um modo selectivo com grupos ácido carboxílico activados, tais como ácido carboxílico activado com carbodi-imida, e ésteres de N-hidroxissuccinimida de ácidos carboxílicos.

Dependendo de como se deseja desenhar o conjugado alvo, possuindo um único local reactivo selectivo, *i.e.* um local de derivatização com uma amina ou hidrazida no polissacárido, são possíveis várias opções. Pode-se ligar selectivamente o polissacárido despolimerizado derivatizado com hidrazida ou amina directamente aos grupos ácido carboxílico de proteína, utilizando quer EDAC quer EDAC na presença de N-hidroxissuccinimida. Alternativamente, o polissacárido despolimerizado derivatizado pode ser adicionalmente derivatizado com hidrazida ou amina com outras moléculas pequenas activadas, tais como ligantes bifuncionais disponíveis comercialmente (*i.e.*, qualquer molécula química possuindo duas porções reactivas distintas cada uma capaz de formar uma ligação com uma proteína e/ou um aminoácido), e isto permitirá a reacção com outros grupos na proteína tais como grupos amino e/ou tiol.

Adicionalmente, está bem dentro do entendimento do técnico competente escolher as condições de reacção apropriadas para praticar o presente invento, dadas as linhas

de orientação gerais aqui proporcionadas, *i.e.*, especificamente no que se refere à escolha do polissacárido e proteína de interesse, agentes de redução, condições tampão e porções de ligação apropriadas, sem sair do espírito do âmbito do invento.

O polissacárido e/ou a proteína à qual se pretende que este seja ligado contém preferivelmente um ou mais dos seguintes: um epítopo de interesse, um modulador da resposta biológica ou um factor de crescimento. No que se refere a estes termos, é feita referência à discussão seguinte, e geralmente a Kendrew, THE ENCYCLOPEDIA OF MOLECULAR BIOLOGY (Blackwell Science Ltd., 1995) e Sambrook, Fritsch e Maniatis, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2.<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

Um epítopo de interesse é uma região imunologicamente relevante de um antigénio ou imunogénio ou seu fragmento imunologicamente activo, *e.g.*, a partir de um patogénio ou toxina de interesse humano ou veterinário. Um epítopo de interesse pode ser preparado a partir de um antigénio de um patogénio ou toxina, *e.g.*, um antigénio de um patogénio ou toxina de humano, ou a partir de outro antigénio ou toxina que induz uma resposta em relação ao patogénio, tal como, por exemplo: um antigénio de morbilivírus, *e.g.*, um antigénio de vírus da cinomose canina ou de sarampo ou de peste bovina tal como HA ou F; uma glicoproteína da raiva, *e.g.*, glicoproteína G da raiva; antigénio de influenza, *e.g.*, antigénio de vírus influenza HA ou N ou de influenza aviária, *e.g.*, influenza HA de peru, antigénio de influenza Chicken/Pennsylvania/1/83 tal como uma nucleoproteína (NP); um antigénio de vírus de leucemia de bovino, *e.g.*, gp51,30 de envelope; um antigénio do Vírus da Doença de Newcastle (NDV), *e.g.*, HN ou F; um antigénio de vírus de leucemia de felino (FeLV), *e.g.*, proteína de envelope de FeLV; RAV-1 env; matriz e/ou peplómero de vírus de bronquite infecciosa; uma glicoproteína de vírus herpes, *e.g.*, uma glicoproteína de vírus herpes de felino, vírus herpes de equino, vírus herpes de bovino, vírus da pseudo-raiva, vírus herpes canino, HSV, vírus da Doença de Marek, Epstein-Barr ou citomegalovírus; um antigénio de flavivírus, *e.g.*, um antigénio de vírus de encefalite japonesa (JEV), um antigénio de Febre-amarela, ou um

antigénio do vírus Dengue; um antigénio de malária (*Plasmodium*), um antigénio de vírus de imunodeficiência, e.g., um antigénio de vírus de imunodeficiência de felino (FIV) ou um antigénio de vírus de imunodeficiência de símio (SIV) ou um antigénio de vírus de imunodeficiência de humano (HIV); um antigénio de parvovírus, e.g., parvovírus canino; um antigénio de influenza de equino; um antigénio de poxvírus, e.g., um antigénio de ectromelia, um antigénio de poxvírus de canário ou antigénio de poxvírus de frango; um antigénio de vírus de doença bursal infecciosa, e.g., VP2, VP3, VP4; um antigénio de vírus de hepatite, e.g., HBsAg; um antigénio de vírus Hantaan; um antigénio de *C. tetani*; um antigénio de papeira; um antigénio pneumocócico, e.g., PspA; um antigénio de *Borrelia*, e.g., OspA, OspB, OspC de *Borrelia* associada a doença de Lyme tal como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii*; ou um antigénio de pox de galinha (varicela zóster). Assim, a proteína e/ou polissacárido podem ser um antigénio ou imunogénio, ou uma sua porção contendo um epítipo. É actualmente preferido utilizar um epítipo de interesse a partir de *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*.

Tal como para epítipos de interesse, um perito na especialidade pode determinar um epítipo ou região imunodominante de um péptido ou polipéptido a partir do conhecimento na especialidade, sem experimentação indevida.

Por exemplo, um epítipo de interesse pode ser gerado a partir do conhecimento dos aminoácidos e das sequências de ADN correspondentes do péptido ou polipéptido, bem como a partir da natureza de aminoácidos particulares (e.g., tamanho, carga, etc.) e do dicionário de codões, sem experimentação indevida. Ver, e.g., Ivan Roitt, *Essential Immunology*, 1988; Kendrew, *supra*; Janis Kuby, *Immunology*, 1992 e.g., págs. 79-81. Algumas linhas de orientação, para determinar se uma proteína é um epítipo de interesse que estimulará uma resposta, incluem: comprimento do péptido - o péptido deverá ter pelo menos 8 ou 9 aminoácidos de comprimento para caber no complexo MHC de classe I e pelo menos 13-25 aminoácidos de comprimento para caber num complexo MHC de classe II. Este comprimento é um mínimo para

o péptido se ligar ao complexo MHC. Prefere-se que os péptidos sejam mais longos do que estes comprimentos porque as células podem cortar os péptidos. O péptido deverá conter um motivo âncora apropriado que lhe permitirá ligar-se às várias moléculas de classe I ou classe II com especificidade elevada o suficiente para gerar resposta imunitária (ver Bocchia, M. et al., "Specific Binding of Leukemia Oncogene Fusion Protein Peptides to HLA Class I Molecules", Blood 85:2680-2684; Engelhard V.H., "Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules" Ann. Rev. Immunol. 12:181 (1994)). Isto poderá ser efectuado, sem experimentação indevida, comparando a sequência da proteína de interesse com estruturas publicadas de péptidos associados às moléculas de MHC. Assim, o técnico competente pode determinar um epítipo de interesse por comparação da sequência de proteína com sequências listadas na base de dados de proteínas.

Ainda adicionalmente, outro método é simplesmente gerar porções de uma proteína de interesse, gerar anticorpos monoclonais para essas porções da proteína de interesse, e depois determinar se esses anticorpos inibem o crescimento *in vitro* do patogénio a partir do qual a proteína foi derivada.

Por conseguinte, o técnico competente pode utilizar as linhas de orientação nesta divulgação e na especialidade para gerar porções de uma proteína de interesse para analisar se anticorpos em relação a esta inibem ou não o crescimento *in vitro*. Por exemplo, o técnico competente pode gerar porções de uma proteína de interesse por selecção de porções da proteína de 8 a 9 ou 13 a 25 aminoácidos de comprimento, selecção de regiões hidrófilas, selecção de porções que mostraram ligar-se a partir de dados de raios X do complexo de antigénio (a todo o comprimento) - anticorpo, selecção de regiões que diferem em sequência de outras proteínas, selecção de motivos de ligação de ancoragem de HLA potenciais, ou qualquer combinação destes métodos ou outros métodos conhecidos na especialidade.

Epítopos reconhecidos por anticorpos são expressos sobre a superfície de uma proteína. Para determinar as regiões de uma proteína que muito provavelmente estimulam uma resposta

de anticorpo, um perito na especialidade pode preferivelmente realizar um mapa de epítomos, utilizando os métodos gerais acima descritos, ou outros métodos de mapeamento conhecidos na especialidade.

Como se pode observar a partir do anterior, sem experimentação indevida, a partir desta divulgação e do conhecimento da especialidade, o técnico competente pode determinar a sequência de aminoácidos de um epítomo de interesse para obter uma resposta de célula T, célula B e/ou anticorpo para utilização na prática do invento. Adicionalmente, é feita referência a Gefter *et al.*, Patente dos E.U.A. N.º 5019384, concedida em 28 de Maio de 1991, e aos documentos aí citados (note-se especialmente a secção "Literatura Relevante" desta patente, e a coluna 13 desta patente que divulga que: "Foi definido um grande número de epítomos para uma ampla variedade de organismos de interesse. São de interesse particular aqueles epítomos aos quais são dirigidos anticorpos de neutralização. Divulgações destes epítomos estão em muitas das referências citadas na secção Literatura Relevante.")

No que se refere a um modulador da resposta biológica, é feita referência a Wohlstadter, "Selection Methods" WO 93/19170, publicada em 30 de Setembro de 1993, e aos documentos aí citados. O técnico competente pode obter um modulador da resposta biológica para utilização no invento, sem qualquer experimentação indevida.

Um factor de crescimento pode ser definido como péptidos de sinalização intercelulares, actuando localmente, multifuncionais, que controlam tanto a ontogenia como a manutenção de tecidos e função (ver Kendrew, *supra*, especialmente na página 455 *et seq.*). O técnico competente pode obter um factor de crescimento para utilização no invento, sem qualquer experimentação indevida.

Em relação às construções do invento, deverá ser entendido que, na prática do invento, se podem utilizar técnicas para purificação de proteínas, e estas técnicas, em geral, incluem técnicas padrão de purificação de proteínas para purificação adicional da proteína de interesse,

incluindo: precipitação tirando vantagem da solubilidade da proteína de interesse para concentrações de sal variáveis, precipitação com solventes orgânicos, polímeros e outros materiais, precipitação por afinidade e desnaturação selectiva; cromatografia de coluna, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia de permuta iónica, afinidade, imunoafinidade ou pigmento-ligando; imunoprecipitação e a utilização de filtração em gel, métodos electroforéticos, ultrafiltração e focagem isoeléctrica. Cada um dos métodos acima identificados está bem dentro do conhecimento do técnico competente, e não é requerida qualquer experimentação indevida para purificar as construções do invento, utilizando as metodologias padrão aqui definidas, e na literatura, bem como os ensinamentos nos Exemplos abaixo.

O invento refere-se ainda a uma composição imunogénica, imunológica ou de vacina contendo a construção do invento e opcionalmente um transportador ou diluente aceitável (e.g., veterinariamente aceitável ou farmacologicamente aceitável). Uma composição imunológica contendo a construção induz uma resposta imunológica - local ou sistémica. A resposta pode ser mas não é necessário que seja protectora. Do mesmo modo, uma composição imunogénica induz uma resposta imunológica local ou sistémica que pode ser mas não é necessário que seja protectora. Uma composição de vacina induz uma resposta protectora local ou sistémica. Por conseguinte, os termos "composição imunológica" e "composição imunogénica" incluem uma "composição de vacina" (visto que os dois primeiros termos podem ser composições protectoras).

Deste modo, o invento proporciona também uma construção do invento ou uma composição imunogénica, imunológica ou de vacina compreendendo a construção do invento e um transportador ou diluente aceitável para utilização num método de indução de uma resposta imunológica num vertebrado compreendendo administrar ao vertebrado uma construção do invento ou uma composição imunogénica, imunológica ou de vacina compreendendo a construção do invento e um transportador ou diluente aceitável. Para efeitos deste fascículo, "animal" inclui todas as espécies vertebradas, excepto humanos; e "vertebrado" inclui todos os vertebrados,

incluindo animais (tal como "animal" é aqui utilizado) e humanos. E, obviamente, um subconjunto de "animal" é o "mamífero" que, para efeitos deste fascículo, inclui todos os mamíferos, excepto humanos.

No que se refere a antigénios para utilização em composições imunológicas ou de vacina, é feita referência aos documentos aqui citados, às discussões apresentadas nos documentos aqui citados e ao conhecimento na especialidade, e.g., Stedman's Medical Dictionary (24.<sup>a</sup> edição, 1982, e.g., definição de vacina; para uma lista de antigénios utilizados em formulações de vacina; estes antigénios ou epítomos de interesse a partir desses antigénios podem ser utilizados no invento, quer como uma construção sozinha, quer numa composição multivalente contendo pelo menos uma construção do invento).

Quando a construção compreende um factor de crescimento e/ou modulador da resposta biológica, o invento proporciona também uma composição terapêutica contendo a construção do invento e opcionalmente um transportador ou diluente aceitável (e.g., veterinariamente aceitável ou farmacologicamente aceitável), e.g. para utilização num método para tratamento de um vertebrado, animal ou humano necessitado de tratamento compreendendo administrar a construção ou composição compreendendo a construção ao vertebrado, animal ou humano. Adicionalmente, uma vez que composições imunológicas, antigénicas, imunogénicas ou de vacina estão agora a ser utilizadas em terapias, o invento compreende uma composição terapêutica contendo a construção do invento compreendendo um epítomo de interesse e opcionalmente um transportador ou diluente aceitável (e.g., veterinariamente aceitável ou farmacologicamente aceitável), e.g. para utilização num método para tratamento de um vertebrado, animal ou humano necessitado de tratamento compreendendo administrar a construção ou composição compreendendo a construção ao vertebrado, animal ou humano.

O procedimento de administração para as construções do invento, composições do invento tais como composições imunológicas, antigénicas ou de vacina ou composições terapêuticas pode ser uma via parentérica (intradérmica,

intramuscular ou subcutânea). Uma tal administração possibilita uma resposta imunitária sistémica. A administração pode ser através de uma via mucosa, e.g., oral, nasal, genital, etc. Uma tal administração possibilita uma resposta imunitária local.

Mais geralmente, as composições antigénicas, imunológicas ou de vacina ou composições terapêuticas do invento podem ser preparadas de acordo com técnicas padrão bem conhecidas dos peritos nas especialidades farmacêuticas, médicas ou veterinárias. Estas composições podem ser administradas em dosagens e por técnicas bem conhecidas dos peritos nas especialidades médicas ou veterinárias tendo em consideração factores tais como a raça ou espécie, idade, sexo, peso, genética e condição do paciente particular, e a via de administração. As composições podem ser administradas sozinhas, ou podem ser co-administradas ou administradas sequencialmente com outras composições do invento ou com outras composições imunológicas, antigénicas ou de vacina ou composições terapêuticas. Estas outras composições são administradas tendo em consideração os factores anteriormente mencionados.

Exemplos de composições do invento incluem preparações líquidas para administração a orifícios (e.g., oral, nasal, anal, genital, e.g., vaginal, etc.) tais como suspensões, xaropes ou elixires; e preparações para administração parentérica, subcutânea, intradérmica, intramuscular ou intravenosa (e.g., administração injectável) tais como suspensões ou emulsões estéreis. Nestas composições a construção pode estar em mistura com um transportador, diluente ou excipiente adequado tal como água estéril, solução salina fisiológica, glucose ou outros.

As composições antigénicas, imunológicas ou de vacina podem conter tipicamente um adjuvante e uma quantidade da construção para induzir a resposta desejada. Em aplicações humanas, o alúmen (fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio) é um adjuvante típico. A saponina e seu componente purificado Quil A, adjuvante completo de Freund e outros adjuvantes são utilizados em investigação e aplicações veterinárias. Podem também ser utilizadas preparações

definidas quimicamente tais como dipéptido de muramilo, lípido A monofosforilo, conjugados de fosfolípido tais como os descritos por Goodman-Snitkoff *et al.* J. Immunol. 147:410-415 (1991), encapsulação da proteína dentro de um proteolipossoma como descrito por Miller *et al.*, J. Exp. Med. 176:1739-1744 (1992) e encapsulação da proteína em vesículas de lípido tais como vesículas de lípido Novasome™ (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, NH).

A composição pode ser embalada numa forma de dosagem individual para imunização ou tratamento por administração parentérica (e.g., intramuscular, intradérmica ou subcutânea) ou administração a orifícios, e.g., administração perlingual (e.g., oral), intragástrica, mucosa incluindo intra-oral, intra-anal, intravaginal, e outras. E outra vez, a dosagem eficaz e a via de administração são determinadas pela natureza da composição, pela natureza da construção e por factores conhecidos, tais como a linhagem ou espécie ou raça, idade, sexo, peso, genética, condição e natureza do vertebrado ou animal ou humano, bem como a LD<sub>50</sub> e outros procedimentos de rastreio que são conhecidos e não requerem experimentação indevida. As dosagens de construção podem variar desde algumas até algumas centenas de microgramas, e.g., 5 a 500 µg.

Transportadores ou diluentes adequados podem ser água ou uma solução salina tamponada, com ou sem um conservante. A construção pode estar liofilizada para ressuspensão no momento de administração ou pode estar em solução. O transportador pode também ser um sistema polimérico de libertação retardada. Ver, e.g., Kreuter, J., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology", M. Donbrow (Ed). CRC Press, págs. 125-148. A microencapsulação tem sido aplicada à injeção de fármacos microencapsulados para proporcionar uma libertação controlada. Exemplos de polímeros úteis para microencapsulação são policarbonatos, poliésteres, poliuretanos, poliortoésteres e poliamidas, particularmente aqueles que são biodegradáveis.

Um transportador para libertação controlada pode também ser poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA). Ver, e.g., Eldridge, J.H., *et al.* "Current Topics in Microbiology and

Immunology", 1989, 146:59-66. O aprisionamento em microesferas de PLGA de 1 a 10 microns de diâmetro pode ter um efeito adjuvante quando administradas oralmente. O processo de microencapsulação em PLGA utiliza uma separação de fase de uma emulsão de água-em-óleo. O composto de interesse é preparado como uma solução aquosa e o PLGA é dissolvido em solventes orgânicos adequados tais como diclorometano e acetato de etilo. Estas duas soluções imiscíveis são co-emulsionadas por agitação a alta velocidade. Adiciona-se depois um não solvente para o polímero, causando a precipitação do polímero à volta das gotículas oleosas para formar microcápsulas embrionárias. As microcápsulas são recolhidas e estabilizadas com um de vários agentes (poli(álcool vinílico) (PVA), gelatina, alginatos, polivinilpirrolidona (PVP), metilcelulose) e remove-se o solvente quer por secagem *in vacuo* quer por extracção por solventes.

Assim, estão previstas composições sólidas, incluindo sólido contendo líquido, líquidas e em gel (incluindo "gel caps").

Adicionalmente, as construções do invento podem ser utilizadas em qualquer regime de imunização ou administração desejado; *e.g.*, como parte de vacinações periódicas tais como vacinações anuais tal como nas especialidades veterinárias ou como vacinações periódicas como na especialidade de medicina humana, ou como num regime de provocação inicial-reforço, onde uma construção ou composição do invento compreendendo uma construção é administrada quer antes quer após administração do mesmo epítipo de interesse ou de um epítipo de interesse diferente ou de uma construção compreendendo este mesmo epítipo de interesse ou um epítipo de interesse diferente.

Adicionalmente, as construções do invento podem ser utilizadas para estimular uma resposta em células *in vitro* ou *ex vivo* para reperfusão subsequente num paciente. Se o paciente é seronegativo, a reperfusão é para estimular uma resposta imunitária, *e.g.*, uma resposta imunológica ou antigénica tal como imunização activa. Num indivíduo

seropositivo, a reperfusão é para estimular ou reforçar o sistema imunitário contra um patógeno.

Uma melhor compreensão do presente invento e das suas muitas vantagens será proporcionada a partir dos Exemplos não limitantes seguintes, fornecidos a título de ilustração.

## **EXEMPLOS**

### **Exemplo 1 - Despolimerização de conjugado de polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F**

Os materiais utilizados no processo de despolimerização incluem polissacárido capsular serotipo 19F, tris(hidroximetil)aminometano 50 mM preparado em água destilada estéril, peróxido de hidrogénio a 30%, ácido clorídrico 0,1 N estéril, hidróxido de sódio 0,1 N estéril e solução salina fisiológica estéril (0,85%).

Carregou-se um Wheaton Celstir™ de um litro com 580 ml de tampão tris 50 mM, pH 8,0. Aqueceu-se o tampão a 80°C ± 0,5°C utilizando um banho de água com recirculação a temperatura constante. Quando o tampão atingiu 80°C, adicionaram-se ao tampão aquecido 1500 mg de polissacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F. Após todo o polissacárido se ter dissolvido (tipicamente em 15-30 minutos), ajustou-se o pH a 8,0 ± 0,1. A esta solução adicionaram-se 20 ml de peróxido de hidrogénio a 30% para dar uma concentração final de 1%, e agitou-se a mistura resultante a 80°C durante 30 minutos. Após 30 minutos, arrefeceu-se rapidamente a mistura até à temperatura ambiente, e ajustou-se o pH a 6,0 ± 0,5 utilizando HCl 0,1 N. O polissacárido despolimerizado foi purificado por ultrafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um limite de exclusão de peso molecular (MWCO) de 1000. Utilizaram-se seis volumes de solução salina a 0,85% para remover as espécies de peso molecular baixo. A solução de polissacárido despolimerizado foi concentrada utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron mini-ultrasette equipada, na unidade do canal de filtração, com

uma cassette de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 3000.

O peso molecular do polissacárido despolimerizado foi determinado por passagem através de uma coluna Sephacryl S-200 que foi previamente calibrada utilizando padrões de peso molecular de dextrano. A quantidade de polissacárido recuperado é determinada por ensaio de ramnose (metilpentose) utilizando o método de Dische, Z. & Shettles, L.B. (1948) *Journal of Biological Chemistry* 175, págs. 595-603. O teor em fósforo é determinado pelo método de Bartlett, G.R.J. (1959) *Journal of Biological Chemistry*, 234, 466. A actividade redutora é determinada pelo método de Park, J.T. & Johnson, M.J. (1949) *Journal of Biological Chemistry* 181, págs. 149-151.

Neste estado o polissacárido é adequado para derivatização com uma amina ou hidrazida.

O processo do invento é também utilizado para polissacárido capsular serotipos 9V e 14 derivados de *Streptococcus pneumoniae* e para o grupo A derivado de *Neisseria meningitidis*. A quantidade recuperada de polissacárido 9V e 14 derivatizado é determinada por ensaio de galactose utilizando o método de orcinol/ácido sulfúrico de Weiner, H.E. & Moshin, J.R. (1952) *American Review of Tuberculosis* 68, pág. 594. A quantidade de N-acetilmanosamina no serotipo 9V e a quantidade de N-acetilglucosamina no serotipo 14 é determinada pelo método de Elson, L.A. & Morgan, W.T. (1933) *Biochemical Journal* 27, 1824. A quantidade de grupo A é determinada por ensaio de fósforo pelo método de Bartlett.

### **Exemplo 2 - Derivatização de conjugado de polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F**

Os materiais utilizados no processo de derivatização incluem peróxido de hidrogénio, polissacárido capsular serotipo 19F despolimerizado, da secção A, di-hidrazida de ácido adípico, EDAC, cianoboro-hidreto de sódio, ácido clorídrico 0,1 N estéril, hidróxido de sódio 0,1 N estéril e solução salina fisiológica estéril (0,85%).

Carregou-se um copo de um litro, equipado com uma barra de agitação e sonda de pH, com o polissacárido despolimerizado concentrado preparado de acordo com o Exemplo 1, e diluiu-se com solução salina fisiológica a 0,85% estéril para conseguir uma concentração final na mistura reaccional de 6,0 mg/ml. A esta solução adicionaram-se uma alíquota concentrada de di-hidrazida adípica e EDAC, cada uma dissolvida em solução salina fisiológica a 0,85% estéril, tal que cada uma estivesse numa concentração final na mistura reaccional de 1,0 mg/ml. Depois adicionou-se EDAC à mistura reaccional, manteve-se o pH a  $5,0 \pm 0,1$  durante duas horas utilizando ácido clorídrico 0,1 N, mantendo ao mesmo tempo a temperatura da mistura reaccional a  $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Após duas horas, adicionou-se à mistura reaccional uma alíquota concentrada de cianoboro-hidreto de sódio, dissolvida em solução salina fisiológica a 0,85% estéril, tal que a concentração final na mistura reaccional fosse 2,0 mg/ml. Manteve-se o pH da mistura reaccional a  $5,0 \pm 0,1$  durante uma hora a  $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , e deixou-se a mistura reaccional agitar à mesma temperatura durante 44 horas  $\pm$  4 horas. Após este período de reacção, ajustou-se o pH a  $6,0 \pm 0,1$ , e purificou-se o polissacárido derivatizado por ultrafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 1000. Utilizaram-se seis volumes de solução salina fisiológica a 0,85% para remover as moléculas pequenas. Concentrou-se o polissacárido derivatizado utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron mini-ultrasette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 3000. A quantidade de polissacárido foi determinada pelos métodos descritos no Exemplo 1. O nível de hidrazida é determinado pelo método do ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico de Snyder, S.L. & Sobocinski, P.Z. (1975) *Analytical Biochemistry* 64, págs. 284-288.

O método do invento foi também utilizado para preparar serotipos 9V e 14 derivados de *Streptococcus pneumoniae* e grupo A derivado de *Neisseria meningitidis* derivatizados com di-hidrazida adípica.

### **Exemplo 3 - Conjugação de conjugado de polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F**

Os materiais utilizados nesta preparação incluem serotipo 19F derivatizado com di-hidrazida adípica, preparado de acordo com Exemplo 2, toxóide de difteria estéril, EDAC, sulfato de amónio, ácido clorídrico 0,1 N estéril, hidróxido de sódio 0,1 N estéril e solução salina fisiológica estéril (0,85%).

Carregou-se um copo de um litro, equipado com uma barra de agitação e sonda de pH, com o polissacárido derivatizado do Exemplo 2, e diluiu-se com solução salina fisiológica a 0,85% estéril para conseguir uma concentração final na mistura reaccional de 500 nmol de hidrazida reactiva/ml. A esta solução adicionaram-se toxóide de difteria estéril até uma concentração final de 3,8 mg/ml. A reacção foi iniciada por adição de uma alíquota concentrada de EDAC até uma concentração final de 2,25 mg/ml. Ajustou-se o pH da mistura reaccional a  $5,0 \pm 0,1$ , e manteve-se este pH durante duas horas utilizando ácido clorídrico 0,1 N. Após duas horas, ajustou-se o pH a  $7,0 \pm 0,1$  utilizando hidróxido de sódio 0,1 N estéril, e a mistura reaccional foi armazenada a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 21 horas  $\pm$  3 horas.

Após este período, aqueceu-se a mistura até  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , e ajustou-se o pH a  $6,5 \pm 0,5$  utilizando ácido clorídrico 0,1 N estéril. Submeteu-se a mistura reaccional a três precipitações sucessivas com sulfato de amónio como se segue. Adicionou-se sulfato de amónio como um sólido até 70% de saturação, e recolheu-se por centrifugação o conjugado precipitado. Dissolveu-se o conjugado em solução salina fisiológica a 0,85% estéril, e repetiu-se o processo de precipitação. Após a terceira precipitação, submeteu-se o conjugado a diafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 30 000. Utilizaram-se seis volumes de solução salina fisiológica a 0,85% para remover as moléculas pequenas. O conjugado diafiltrado foi primeiro filtrado através de uma cápsula de filtro contendo um filtro

de 1,2  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$ , e depois filtrado através de uma segunda cápsula de filtro contendo um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . A quantidade de polissacárido é determinada pelos métodos descritos no Exemplo 1. A quantidade de proteína é determinada pelo ensaio de proteína de Lowry, O.H. et al. (1951) Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.

O processo do invento é também utilizado para preparar conjugados de polissacárido para os serotipos 9V e 14 derivados de *Streptococcus pneumoniae*, e grupo A de *Neisseria meningitidis*.

#### **Exemplo 4 - Despolimerização de conjugado de polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B**

Os materiais utilizados nesta preparação incluem polissacárido capsular serotipo 6B derivado de *Streptococcus pneumoniae*, tampão de fosfato de sódio 100 mM estéril, ácido clorídrico 0,1 N estéril, hidróxido de sódio 0,1 N estéril, peróxido de hidrogénio a 30% e solução salina fisiológica estéril (0,85%).

Carregou-se um Wheaton Celstir™ de um litro com 580 ml de tampão de fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0. Aqueceu-se o tampão a 75°C  $\pm$  0,5°C utilizando um banho de água com recirculação a temperatura constante. Quando o tampão atingiu 75°C  $\pm$  0,5°C, adicionaram-se ao tampão aquecido 1500 mg de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B. Após todo o polissacárido se ter dissolvido, ajustou-se o pH da mistura a 8,0  $\pm$  0,1. A esta solução adicionaram-se 20 ml de peróxido de hidrogénio a 30% para se conseguir uma concentração final de peróxido de 1%. Manteve-se a mistura resultante a 75°C durante 25-35 minutos. Uma vez decorrido o tempo alocado, arrefeceu-se rapidamente a mistura até à temperatura ambiente, e baixou-se o pH da mistura para 6,0  $\pm$  0,5 utilizando HCl 0,1 N. O polissacárido despolimerizado foi purificado por ultrafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 1000. Utilizaram-se seis volumes de solução salina a 0,85% para remover as espécies de peso molecular baixo. A solução de

polissacárido despolimerizado foi concentrada utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron mini-ultrasette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 3000.

As determinações de peso molecular, actividade redutora, teor em fósforo e ramnose foram realizadas como no Exemplo 1.

O processo do presente invento foi utilizado para polissacáridos capsulares serotipos 3, 4, 7F, 18C e 23F derivados de *Streptococcus pneumoniae*. A quantidade de serotipo 3 é determinada por ensaio de ácido glucurónico utilizando o método de Dische, Z. (1947) Journal of Biological Chemistry 167, pág. 189, e a quantidade de glucose é determinada utilizando o método de orcinol/ácido sulfúrico de Weiner & Moshin. A quantidade de serotipo 4 é determinada por ensaio de galactose pelo método de orcinol/ácido sulfúrico de Weiner & Moshin, a quantidade de N-acetilmanosamina e N-acetilgalactosamina é determinada pelo método de Elson & Morgan. A quantidade de serotipo 7F é determinada por ensaio de ramnose pelo método de Dische & Shettles, a quantidade de galactose é determinada pelo método de orcinol/ácido sulfúrico de Weiner & Moshin, a quantidade de N-acetilglucosamina e N-acetilgalactosamina é determinada pelo método de Elson & Morgan. A quantidade de serotipo 18C é determinada por ensaio de ramnose pelo método de Dische & Shettles, a quantidade de fósforo é determinada pelo método de Bartlett e a quantidade de galactose é determinada pelo método de orcinol/ácido sulfúrico de Weiner & Moshin. A quantidade de serotipo 23F é determinada por ensaio de ramnose pelo método de Dische & Shettles, a quantidade de fósforo é determinada pelo método de Bartlett e a quantidade de galactose é determinada pelo método orcinol/ácido sulfúrico de Weiner & Moshin. Os pesos moleculares e o teor de actividade redutora de cada um dos polissacáridos listados neste exemplo foram determinados pelos métodos descritos no Exemplo 1.

**Exemplo 5 - Derivação de conjugado de polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B**

O método e os materiais descritos no Exemplo 2 são utilizados para preparar polissacárido capsular serotipo 6B derivatizado com hidrazida de ácido adípico. Este mesmo conjunto de procedimentos de reacção é também utilizado para preparar polissacáridos capsulares serotipos 3, 4, 7F, 18C e 23F derivados de *Streptococcus pneumoniae* derivatizados com ácido adípico.

**Exemplo 6 - Despolimerização de conjugado de polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B**

O método e os materiais descritos no Exemplo 3 são utilizados para preparar o conjugado de polissacárido serotipo 6B. O mesmo conjunto de procedimentos de reacção é também utilizado para preparar conjugados de polissacárido serotipos 3, 4, 7F, 18C e 23F derivados de *Streptococcus pneumoniae*.

**Exemplo 7 - Despolimerização de conjugado de polissacárido de *Neisseria meningitidis* grupo A**

Os materiais utilizados nesta preparação incluem polissacárido capsular grupo A derivado de *Neisseria meningitidis*, tampão tris 50 mM estéril, ácido clorídrico 0,1 N estéril, hidróxido de sódio 0,1 N estéril, peróxido de hidrogénio a 30% e solução salina fisiológica estéril (0,85%).

Carregou-se um Wheaton Celstir™ de um litro com 580 ml tampão citrato 50 mM, pH 6,0. Aqueceu-se o tampão a 60°C ± 0,5°C utilizando um banho de água com recirculação a temperatura constante. Quando o tampão atingiu 60°C, adicionaram-se ao tampão aquecido 1500 mg de polissacárido capsular de *Neisseria meningitidis* grupo A. Após todo o polissacárido se ter dissolvido, ajustou-se o pH a 6,0 ± 0,1. A esta solução adicionaram-se 20 ml de peróxido de hidrogénio a 30% para dar uma concentração final de 1%, e agitou-se a mistura resultante a 60°C durante 120 minutos.

Neste Exemplo, operou-se a reacção a uma velocidade lenta de modo a monitorizar o peso molecular do polissacárido utilizando uma coluna HPSEC, em que são efectuados cromatogramas a cada 15 minutos. Após 120 minutos, arrefeceu-se rapidamente a mistura até à temperatura ambiente. O polissacárido despolimerizado foi purificado por ultrafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassette de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 1000. Utilizaram-se seis volumes de solução salina a 0,85% para remover as espécies de peso molecular baixo. A solução de polissacárido despolimerizado foi concentrada utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron mini-ultrasette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassette de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 3000.

O peso molecular, a actividade redutora e o teor em fósforo foram determinados como descrito no Exemplo 1.

#### **Exemplo 8 - Derivatização de conjugado de polissacárido de *Neisseria meningitidis* grupo A**

Os materiais utilizados nesta preparação incluem polissacárido capsular derivado de *Neisseria meningitidis* grupo A despolimerizado por peróxido de hidrogénio, da secção A, di-hidrazida de ácido adípico, EDAC, cianoboro-hidreto de sódio, sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carboxilato, ácido clorídrico 0,1 N estéril, hidróxido de sódio 0,1 N estéril e solução salina fisiológica estéril (0,85%).

Carregou-se um *fleaker* de um litro, equipado com uma barra de agitação e sonda de pH, com o polissacárido despolimerizado concentrado, da secção A, e diluiu-se com solução salina fisiológica a 0,85% estéril para conseguir uma concentração final na mistura reaccional de 6,0 mg/ml. A esta solução adicionaram-se uma alíquota concentrada de di-hidrazida adípica e EDAC, cada uma dissolvida em solução salina fisiológica a 0,85% estéril, tal que cada uma estivesse numa concentração final na mistura reaccional de 1,0 mg/ml. Depois adicionou-se EDAC à mistura reaccional,

manteve-se o pH a  $5,0 \pm 0,1$  durante duas horas utilizando ácido clorídrico 0,1 N, mantendo ao mesmo tempo a temperatura da mistura reaccional a  $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Após duas horas, adicionou-se à mistura reaccional, uma alíquota concentrada de cianoboro-hidreto de sódio, dissolvida em solução salina fisiológica a 0,85% estéril, tal que a concentração final na mistura reaccional fosse 2,0 mg/ml. Manteve-se o pH da mistura reaccional a  $5,0 \pm 0,1$  durante uma hora a  $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , e depois deixou-se a mistura reaccional agitar à mesma temperatura durante 44 horas  $\pm$  4 horas. Após este tempo de reacção, ajustou-se o pH a  $6,0 \pm 0,1$ , e purificou-se o polissacárido derivatizado por ultrafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 1000. Utilizaram-se seis volumes de solução salina fisiológica a 0,85% para remover as moléculas pequenas. Concentrou-se o polissacárido derivatizado utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron mini-ultrasette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 3000. A quantidade de polissacárido foi determinada pelos métodos descritos na secção A. O nível de hidrazida é determinado pelo método do ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico de Snyder, S.L. & Sobocinski, P.Z. (1975) *Analytical Biochemistry* 64, págs. 284-288.

Carregou-se um *fleaker* de um litro, equipado com uma barra de agitação e sonda de pH, com o polissacárido grupo A derivatizado com hidrazida anterior, e diluiu-se com solução salina fisiológica a 0,85% estéril para conseguir uma concentração final de hidrazida reactiva de 1000 nmol de hidrazida reactiva/ml. A esta solução adicionou-se sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato até uma concentração final de 6,6 mg/ml. Ajustou-se o pH da mistura reaccional a  $6,5 \pm 0,1$  e agitou-se a mistura reaccional durante 22 horas  $\pm$  2 horas a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após este tempo de reacção, ajustou-se o pH a  $6,0 \pm 0,1$ , e purificou-se o polissacárido derivatizado com maleimido por ultrafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um

MWCO de 1000. Utilizaram-se seis volumes de solução salina fisiológica a 0,85% para remover as moléculas pequenas. Concentrou-se o polissacárido derivatizado utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron mini-ultrasette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 3000. A quantidade de polissacárido foi determinada pelos métodos descritos na secção A. A quantidade de maleimida é determinada por titulação de tiol utilizando reagente de Ellman.

#### **Exemplo 9 - Conjugação de conjugado de polissacárido de *Neisseria meningitidis* grupo A**

Os materiais utilizados nesta preparação incluem grupo A derivatizado com maleimido, do Exemplo 8, toxóide de difteria estéril, EDAC, dicloridrato de cistamina, ditiotreitol, sulfato de amónio, ácido clorídrico 0,1 N estéril, hidróxido de sódio 0,1 N estéril, solução salina fisiológica estéril (0,85%), e tampão tris 50 mM pH 7,5 estéril, contendo EDTA 0,5 mM.

Carregou-se um *fleaker* de um litro, equipado com uma barra de agitação e uma sonda de pH, com toxóide de difteria estéril, e diluiu-se com solução salina fisiológica a 0,85% para dar uma concentração final de 4 mg/ml. A esta solução adicionou-se uma alíquota concentrada de dicloridrato de cistamina, dissolvida em solução salina fisiológica a 0,85% até uma concentração final de 11 mg/ml. Ajustou-se o pH da mistura a pH  $7,0 \pm 0,1$ , e iniciou-se a reacção por adição de uma alíquota concentrada de EDAC até uma concentração final de 2,25 mg/ml. Manteve-se o pH da mistura reaccional a  $7,0 \pm 0,1$  a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , e depois deixou-se agitar durante 22 horas  $\pm 2$  horas, à mesma temperatura. Após esta reacção, purificou-se a proteína derivatizada por ultrafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minissette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassete de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 10 000. Utilizaram-se seis volumes de tris 50 mM pH 7,5, contendo EDTA 0,5 mM para remover as moléculas pequenas. A quantidade de proteína é determinada pelo método de Lowry. A quantidade de cistamina é determinada quer por ensaio de amina, quer por

titulação de tiol após redução das pontes de dissulfureto utilizando ditioneitol.

Carregou-se um *fleaker* de um litro, equipado com uma barra de agitação e uma sonda de pH, com a toxóide de difteria derivatizada com cistamina, e diluiu-se com tris 50 mM pH 7,5, contendo EDTA 0,5 mM. A isto, adicionou-se ditioneitol como sólido até uma concentração final de 15 mg/ml. Agitou-se a mistura reaccional a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante duas horas. Após este período de reacção, purificou-se a toxóide de difteria derivatizada com cistamina reduzida por ultrafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassette de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 10 000. Utilizaram-se seis volumes de tris 50 mM pH 7,5, contendo EDTA 0,5 mM para remover as moléculas pequenas. A quantidade de proteína é determinada pelo método de Lowry, e a quantidade de tiol é determinada por titulação utilizando reagente de Ellman.

Carregou-se um *fleaker* de um litro, equipado com uma barra de agitação e uma sonda de pH, com a toxóide de difteria derivatizada com cistamina reduzida, e diluiu-se com tris 50 mM pH 7,5, contendo EDTA 0,5 mM até uma concentração final na mistura reaccional de 6 mg/ml. A esta solução adicionou-se um excesso 1,5 molar de grupo A derivatizado com maleimido, da secção B. deixou-se esta mistura reaccional agitar a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante um total de 22 horas  $\pm$  2 horas. Após este período de reacção, ajustou-se o pH da mistura a  $6,5 \pm 0,1$ , e purificou-se o conjugado por três precipitações sucessivas com sulfato de amónio. Após a terceira precipitação, submeteu-se o conjugado a diafiltração utilizando uma unidade de filtração de fluxo tangencial Filtron minisette equipada, na unidade do canal de filtração, com uma cassette de poliétersulfona modificada Omega, com um MWCO de 30 000. Utilizaram-se seis volumes de solução salina fisiológica a 0,85% para remover as moléculas pequenas. O conjugado diafiltrado foi primeiro filtrado através de uma cápsula de filtro contendo um filtro de 1,2  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$ , e depois filtrou-se através de uma segunda cápsula de filtro contendo um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . A quantidade de polissacárido

é determinada pelo fósforo pelo método de Bartlett. A quantidade de proteína é determinada pelo método de Lowry.

O mesmo processo é também utilizado para preparar conjugados de polissacárido para serotipos 3, 4, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F derivados de *Streptococcus pneumoniae*.

#### **REFERÊNCIAS**

1. Dick, W.E. Jr. e Beurret, M. Conjugate Vaccines. Contrib. Microbiol. Immunol. (1989) 10, págs. 48-114, Cruse, J.M. e Lewis, R.E. Jr. eds. Basel, Karger.
2. Santosham, M. (1993) Vaccine 11: 552-557.
3. Isbell, H.S. e Frush, H.L. (1987) Carbohydrate Research 161: 181-193.
4. Yalpani, M. Polysaccharides Syntheses, Modifications and Structure/Property Relations (1988) Elsevier, Amsterdão, págs. 370-388.
5. Park, J.T. e Johnson, M.J. (1949) J. Biol. Chem. 181:149.

Lisboa, 2012-04-16

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparação de uma construção compreendendo um polissacárido e/ou oligossacárido ligados covalentemente a uma molécula de proteína, o referido método compreendendo

despolimerização do referido polissacárido e/ou oligossacárido utilizando peróxido de hidrogénio sob condições hidrolíticas moderadas, gerando desse modo um grupo ácido carboxílico, onde as referidas condições moderadas são uma temperatura de 30°C a 80°C e um pH de 4,5 a 8,0 ± 0,10;

derivatização do polissacárido e/ou oligossacárido despolimerizado com uma molécula seleccionada entre o grupo consistindo em uma amina e uma hidrazida, onde a derivatização é realizada na presença de uma carbodi-imida; e conjugação do referido polissacárido e/ou oligossacárido despolimerizado derivatizado com grupos ácido carboxílico de uma molécula de proteína.

2. Método da reivindicação 1 onde o referido polissacárido é um polissacárido capsular bacteriano seleccionado entre o grupo consistindo em *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F e *Neisseria meningitidis* grupo A, C, 14<sub>135</sub> e Y.

3. Método da reivindicação 1 onde a referida despolimerização é até um peso molecular médio de 10-30 000 daltons.

4. Método da reivindicação 1 onde a referida amina é 1,6-diamino-hexano.

5. Método da reivindicação 1 onde a referida hidrazida é di-hidrazida adípica.

6. Método da reivindicação 1 onde a carbodi-imida é 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodi-imida.

7. Método da reivindicação 1 onde o referido, polissacárido e/ou oligossacárido despolimerizado derivatizado compreende um único local reactivo selectivo.

8. Método da reivindicação 7 onde a referida conjugação compreende ligar directamente o polissacárido e/ou oligossacárido despolimerizado derivatizado a um grupo ácido carboxílico da molécula de proteína.

9. Método da reivindicação 8 onde a referida conjugação compreende adicionalmente a utilização de um reagente de carbodi-imida solúvel em água na presença de N-hidroxissuccinimida.

10. Método da reivindicação 7 onde o referido polissacárido despolimerizado derivatizado é adicionalmente derivatizado com um ligante bifuncional.

11. Método da reivindicação 9 onde o reagente de carbodi-imida solúvel em água é 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodi-imida.

12. Método da reivindicação 1 onde a construção compreende uma porção seleccionada entre o grupo consistindo em um epítipo de interesse, um modulador da resposta biológica e um factor de crescimento.

13. Construção preparada de acordo com o método da reivindicação 1.

14. Construção preparada de acordo com o método de reivindicação 12.

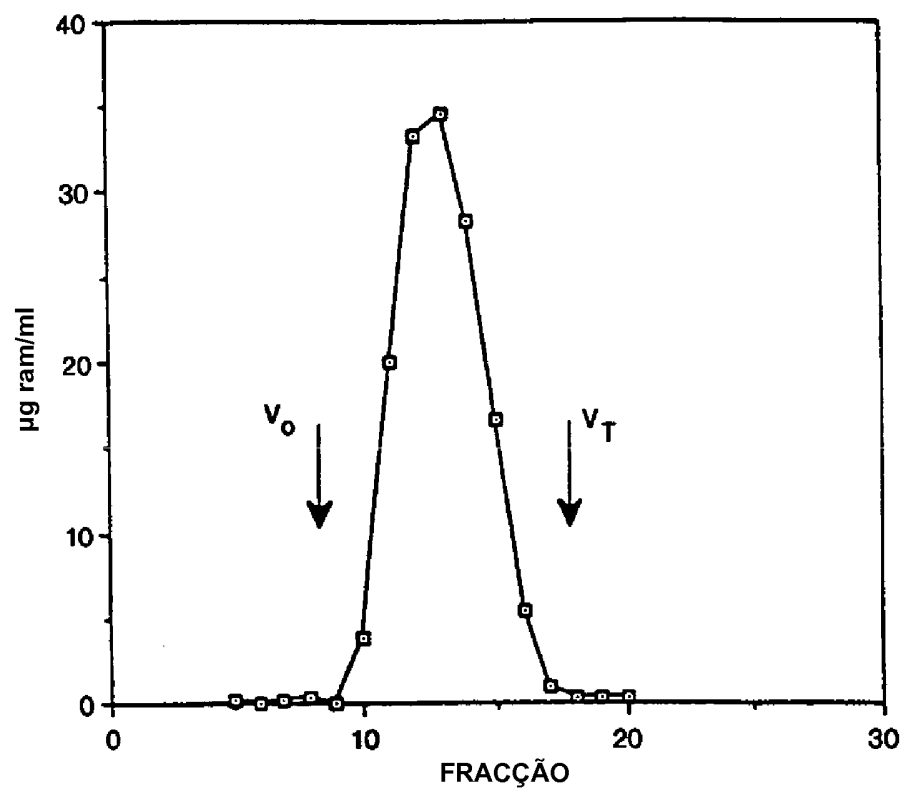
15. Composição imunológica, imunogénica ou terapêutica compreendendo a construção de acordo com a reivindicação 14 e um transportador ou diluente farmacologicamente aceitáveis, onde a proteína da referida construção é capaz de induzir uma resposta imunitária dependente de células T num hospedeiro injectado com a referida proteína.

16. Vacina compreendendo a composição imunológica da reivindicação 15.

17. Construção de acordo com a reivindicação 14 para indução de uma resposta imunológica num vertebrado.

18. Construção de acordo com a reivindicação 14 para utilização em medicina.

Lisboa, 2012-04-16

**FIG. 1A**

FRACÇÃO 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

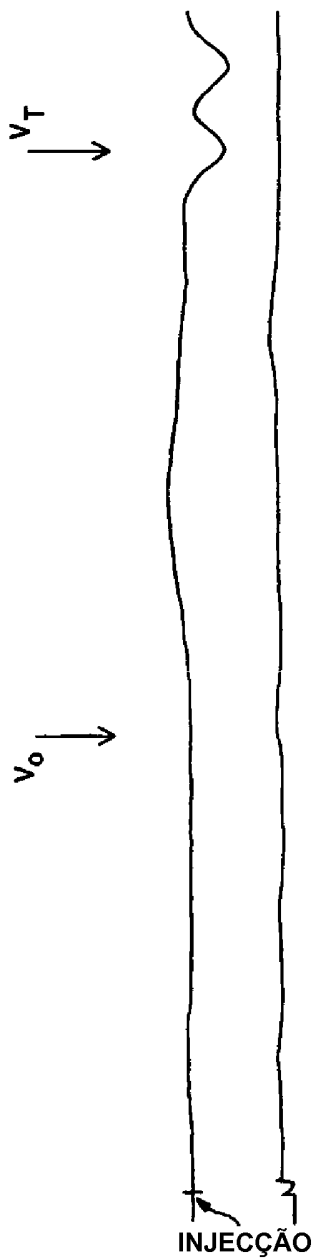


FIG. 1B

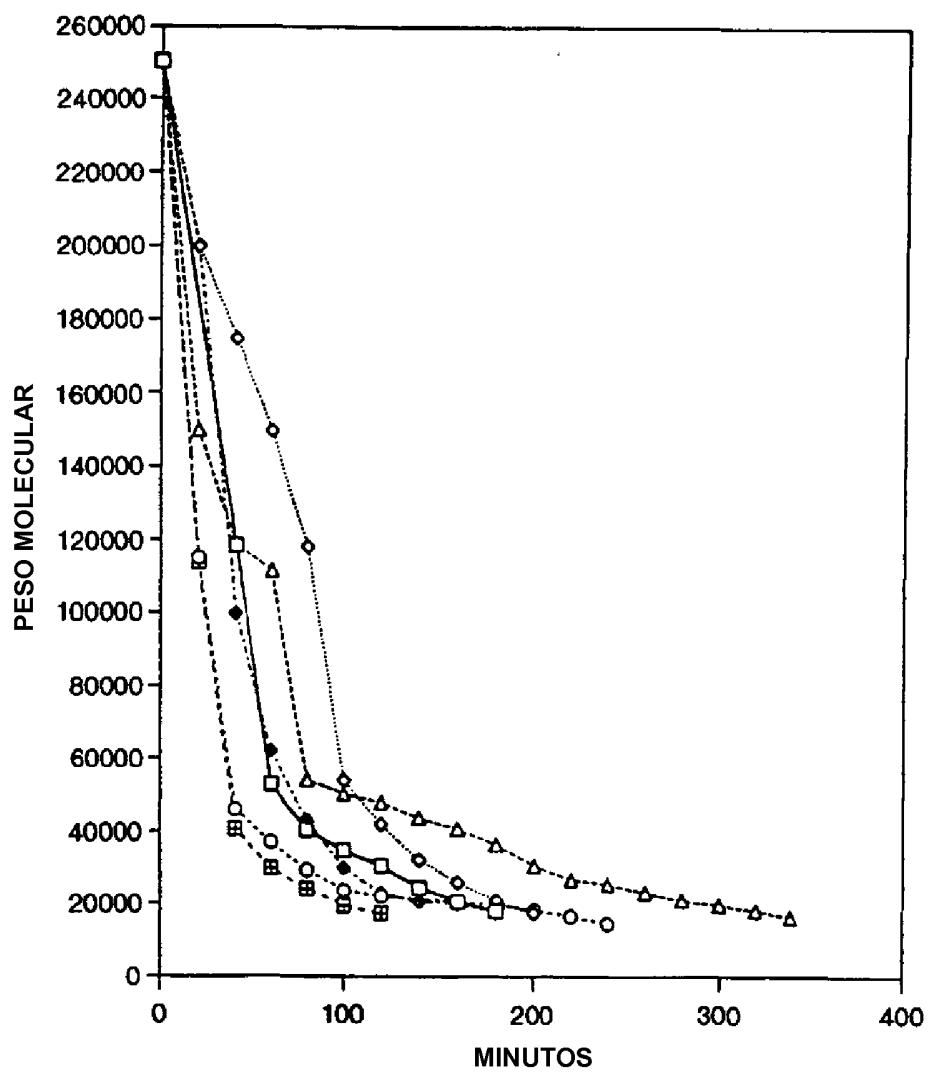
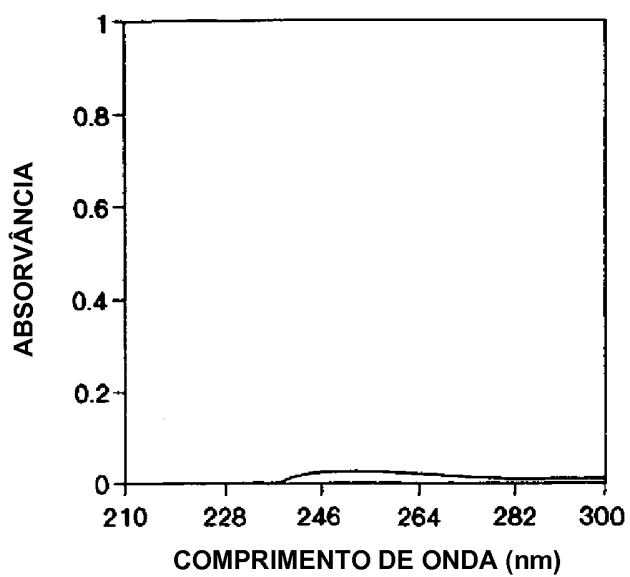
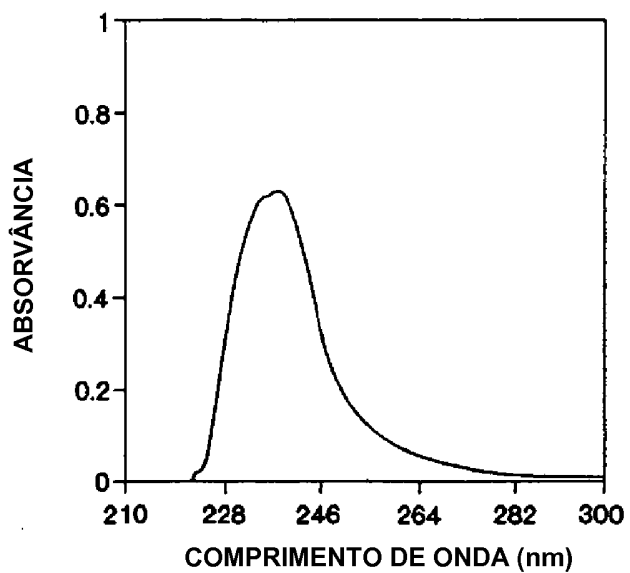


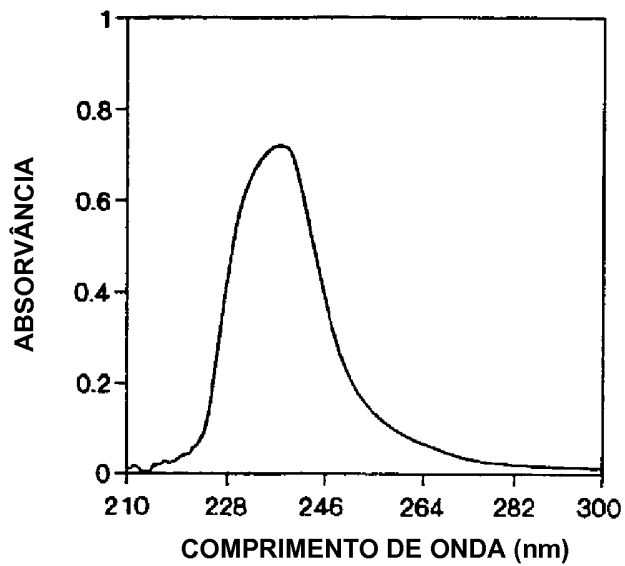
FIG. 1C



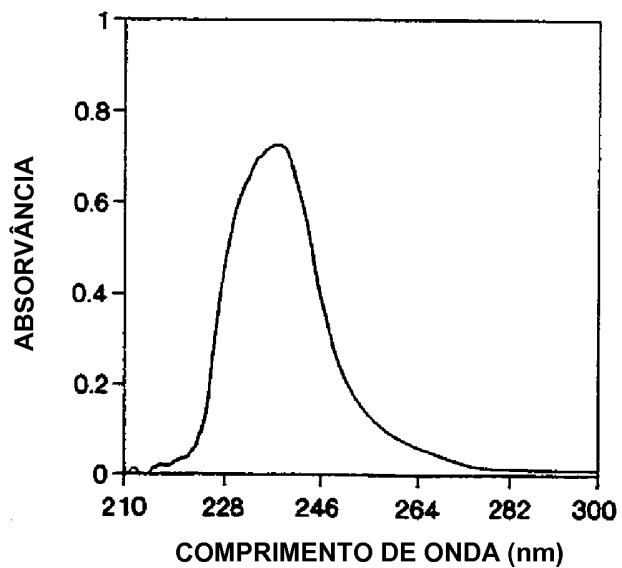
**FIG. 2A-1**



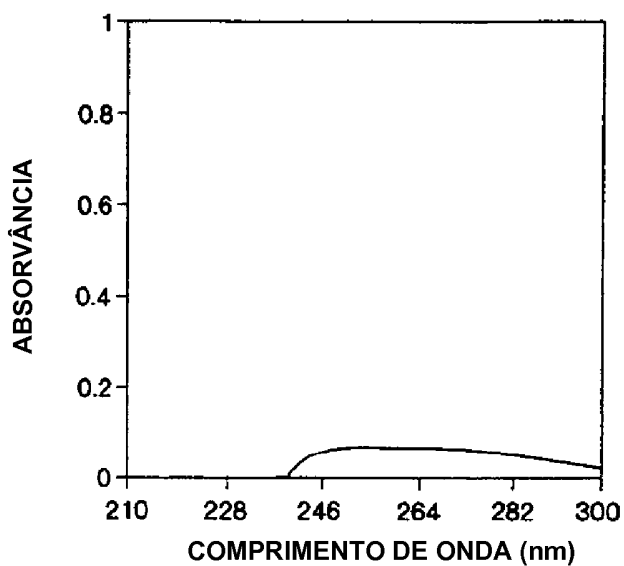
**FIG. 2A-2**



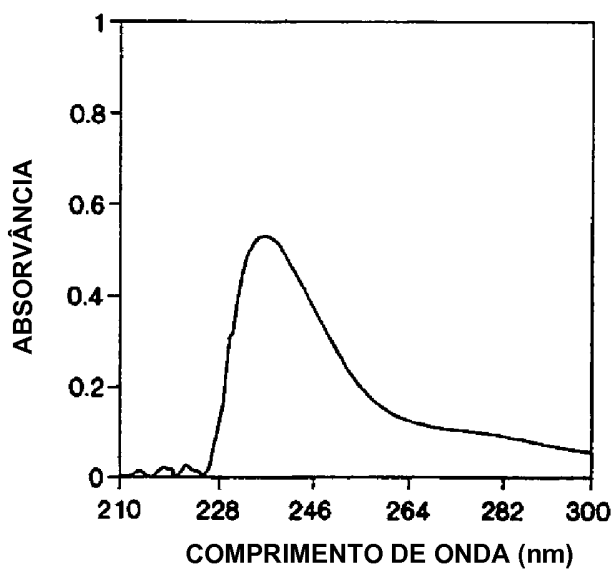
**FIG. 2A-3**



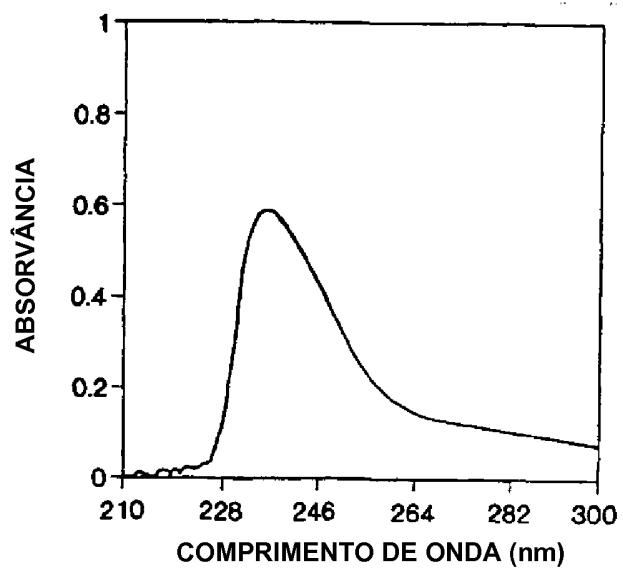
**FIG. 2A-4**



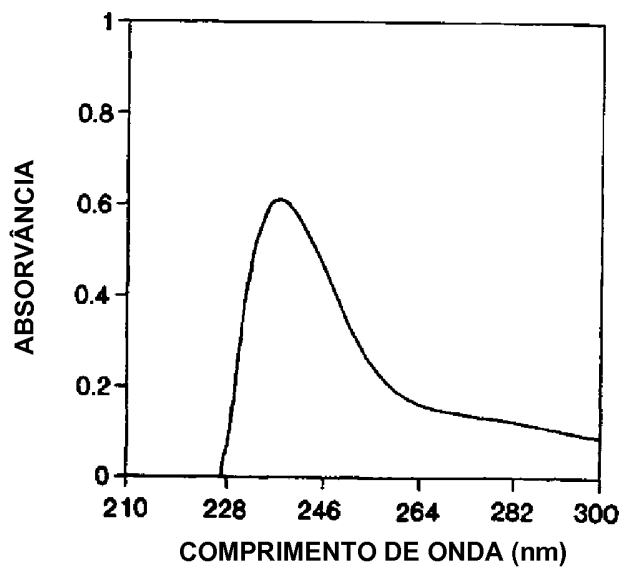
**FIG. 2B-1**



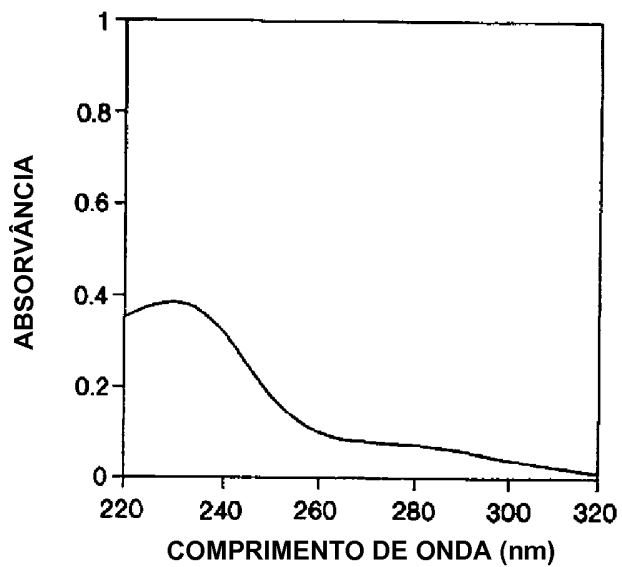
**FIG. 2B-2**



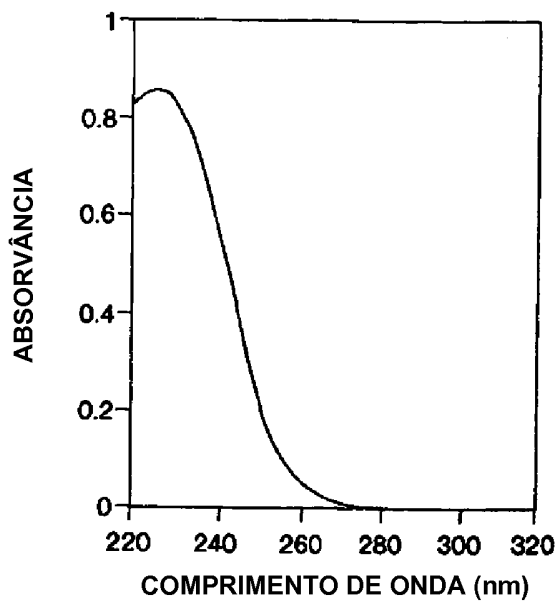
**FIG. 2B-3**



**FIG. 2B-4**



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**

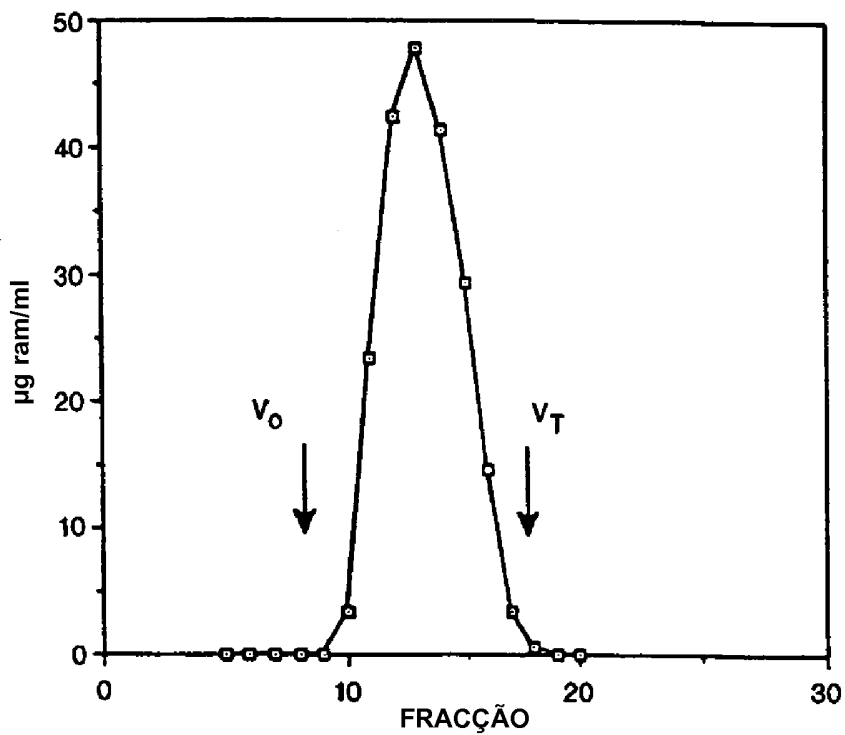


FIG. 4A

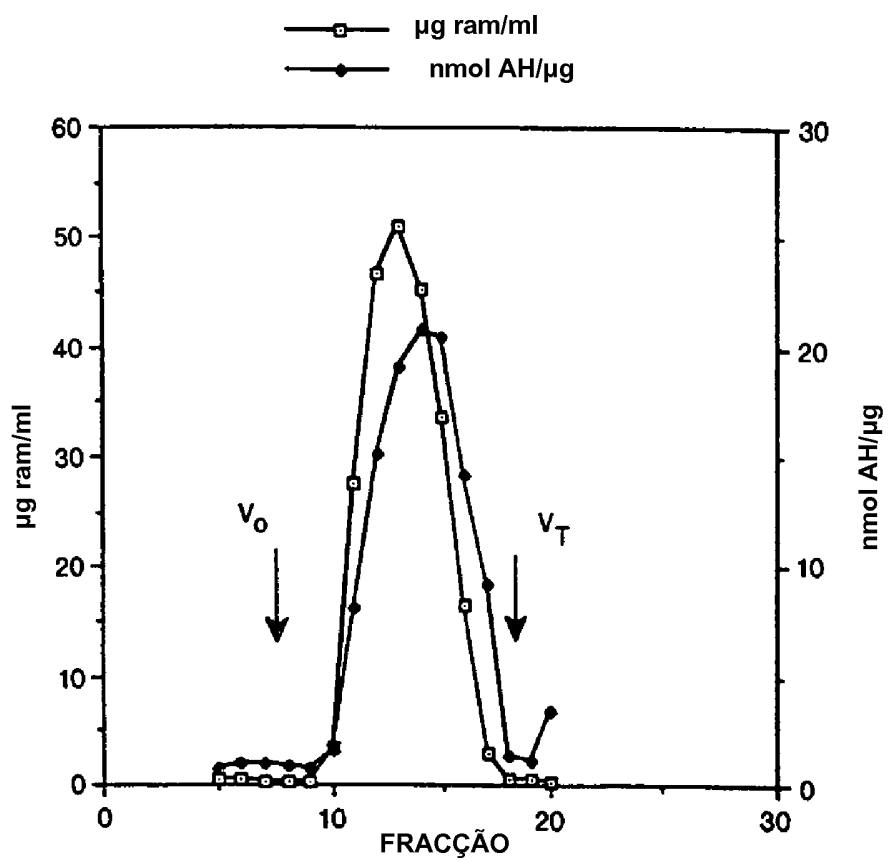


FIG. 4B

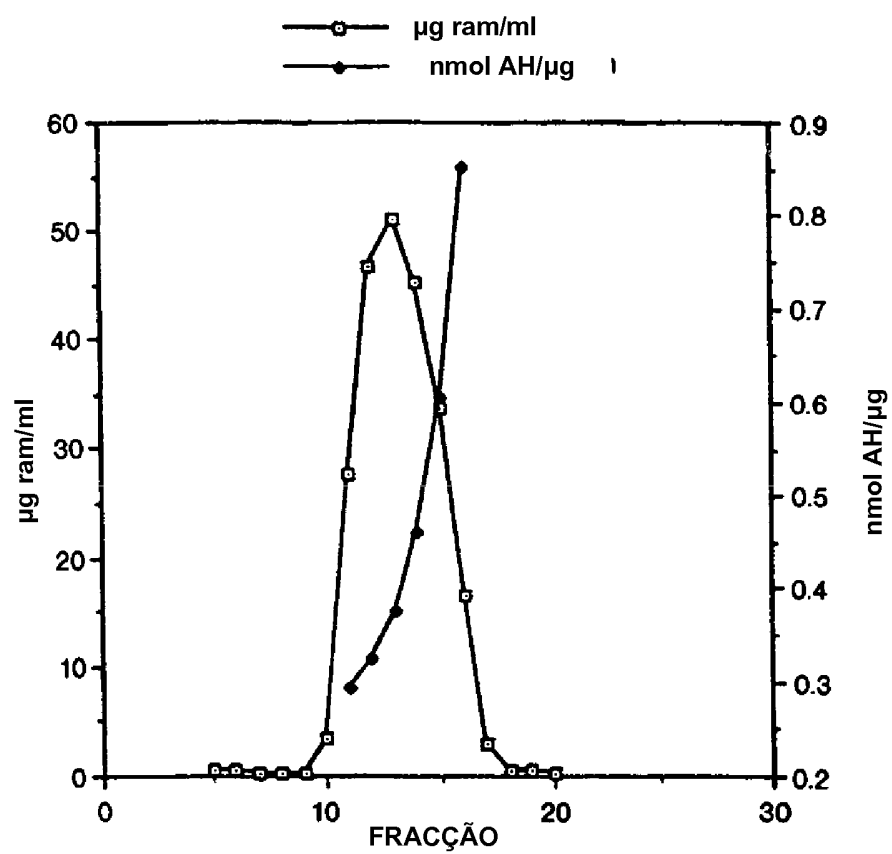


FIG. 4C