



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112019026192-3 B1



(22) Data do Depósito: 11/06/2018

(45) Data de Concessão: 10/05/2022

(54) Título: VACINAS DE CONJUGADO MULTIVALENTE COM POLISSACARÍDEOS DE CONJUGADO BIVALENTE OU MULTIVALENTE QUE FORNECEM IMUNOGENICIDADE E AVIDEZ MELHORADAS

(51) Int.Cl.: A61K 39/09; A61K 47/48.

(30) Prioridade Unionista: 10/06/2017 US 62/517,905.

(73) Titular(es): INVENTPRISE, LLC.

(72) Inventor(es): SUBHASH V. KAPRE; ANUP K. DATTA.

(86) Pedido PCT: PCT US2018036868 de 11/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/227177 de 13/12/2018

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/12/2019

(57) Resumo: A divulgação descreve composições contendo conjugados usando novos ligantes, conjugados de polissacarídeos bivalentes e métodos de conjugação de polissacarídeos bivalentes no desenvolvimento de vacinas de conjugado multivalente. A conjugação de polissacarídeos capsulares com proteínas carreadoras é realizada utilizando ligantes homobifuncionais e/ou heterobifuncionais de comprimentos específicos. A incorporação dos ligantes e seu uso em ligantes bifuncionais induz a maiores títulos de anticorpos funcionais com alta avidéz, provocando maior memória imunológica e redução do efeito da proteína transportadora. Isto fornece polissacarídeos capsulares de reação imunoquimicamente reativas, em que um ou mais polissacarídeos capsulares de reação cruzada são conjugados sequencialmente ou simultaneamente à proteína transportadora usando ligantes bifuncionais com os mesmos ou diferentes grupos funcionais. Esse ligante e o tamanho dos polissacarídeos capsulares fornece uma vacina multivalente conjugada eficaz com altos títulos de anticorpos e um efeito carreador reduzido e resulta na redução do conteúdo do polissacarídeo capsular e proteína por dose de vacina a qual reduz a reatogenicidade.

**VACINAS DE CONJUGADO MULTIVALENTE COM POLISSACARÍDEOS DE
CONJUGADO BIVALENTE OU MULTIVALENTE QUE FORNECEM
IMUNOGENICIDADE E AVIDEZ MELHORADAS**

Referência aos pedidos relacionados

[0001] Este pedido reivindica a prioridade do pedido provisório norte americano nº 62/517,905 depositado em 10 de junho de 2017, a totalidade do qual é especificamente incorporada por referência.

Antecedentes

Campo da invenção

[0002] A presente invenção está direcionada a conjugados multivalentes, composições imunogênicas e vacinas compreendendo proteína carreadora conjugada a polissacarídeos capsulares bacterianos e usos das mesmas. Em particular, composições da invenção compreendem conjugados polissacarídeo capsular bacteriano monovalente e multivalente - proteína, em que os polissacarídeos capsulares bacterianos e oligossacarídeos são derivados de sorotipos de *Streptococcus pneumoniae*. A proteína carreadora é conjugada a polissacarídeos capsulares bacterianos através de ligantes mono funcionais bem como ligantes bi funcionais, preferencialmente de comprimentos definidos, e os ligantes mono funcionais e bi funcionais podem ser homo mono funcionais, homo bi funcionais, hetero mono funcionais ou hetero bifuncionais.

Descrição dos antecedentes

[0003] O *Streptococcus pneumoniae* é um patógeno gram positivo responsável por doenças pneumocócicas

invasivas (DIPs) tais como pneumonia, bacteremia, meningite e otite média aguda. A pneumonia é a manifestação mais comum de doença pneumocócica invasiva, em que o espalhamento bacteriano dentro do trato respiratório pode resultar em infecção do ouvido médio, sinusite ou bronquite recorrente. O pneumococo é encapsulado com um polissacarídeo quimicamente ligado o qual resulte na especificidade do sorotipo. Pelo menos 90 sorotipos pneumocócicos são conhecidos dos quais cerca de 23 correspondem a 90 % das doenças invasivas e o polissacarídeo capsular é um imunógeno fraco.

[0004] Existem atualmente três vacinas contra o PCV disponíveis no mercado global: PREVNAR®, SYNFLORIX®, e PREVNAR-13®. Existe a necessidade de atender às necessidades médicas ainda não atendidas de cobertura da doença pneumocócica devido aos sorotipos não encontrados no PREVNAR-13® e ao potencial de substituição do sorotipo ao longo do tempo. Há uma necessidade de composições imunogênicas que possam ser utilizadas para induzir uma resposta imune contra os sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* adicionais em humanos e em crianças com menos de dois anos de idade.

[0005] Um polissacarídeo capsular (CPS) é uma virulência determinante e geralmente insuficientemente imunogênica para induzir uma resposta imune dependente das células T em bebês e em crianças. A conjugação de uma proteína carreadora com CPS pode induzir uma resposta imune que passa por uma mudança de classe. Assim, uma vacina de conjugado pneumocócico de valência 7 (PCV-7, Pfizer Inc.,

EUA), valência 10 (Synflorox-10, GSK Vaccines) e valência 13 (PCV-13, Pfizer Inc., EUA) foram desenvolvidas para prevenir eficientemente a incidência de DIPs. A química da aminação redutora e a química da cianilação têm sido amplamente utilizadas na preparação das vacinas conjugadas.

[0006] Nestes conjugados, a ligação curta C-N (2.1 Å) entre o CPS e a proteína carreadora leva à blindagem estérica dos epítomos de CPS pela proteína carreadora e baixa proporção CPS / proteína. Os parâmetros importantes são necessários para minimizar as desvantagens das vacinas atuais.

[0007] A patente norte americana nº US 9,492,559 descreve composições imunogênicas compreendendo antígenos de polissacarídeo capsulares conjugados e usos dos mesmos. As composições imunogênicas descritas incluem uma composição de conjugado pneumocócico de valências 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20. É também descrita uma composição de conjugado pneumocócico de valências 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25.

[0008] A publicação do pedido internacional nº WO 2014/097099A2 descreve um processo de glicoconjugação direcionado para diversos sorotipos em adição ao conjugados de valência 13 do PREEVNAR. Novos conjugados de polissacarídeo são adicionados à formulação para aumentar a eficácia da vacina.

[0009] A publicação do pedido de patente norte americano nº US 2011/023526 descreve uma composição de vacina de conjugado de polissacarídeo pneumocócico de

valência 15 -proteína. Esta patente está direcionada para vacinas de conjugado de valência 15 feitos pela adição de dois ou mais sorotipos com vacinas 1 - 3 atualmente disponíveis.

[00010] A publicação do pedido internacional n° WO 2016/207905 descreve vacinas de conjugado pneumocócico multivalente. Este pedido está direcionado a uma vacina de conjugado de valência 13 ou maior e deleção do sorotipo 6A.

[00011] A publicação do pedido de patente norte americano n° US 2017/007713 descreve um ligante contendo ((2-oxoetil) tio) com funcionalidade melhorada.

[00012] A publicação do pedido internacional n° WO 2014/092377 descreve uma composição de valência 13 em que 12 sorotipos foram selecionados a partir do grupo que consiste nos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F e um de 12 ou 9N.

[00013] A publicação do pedido internacional n° WO 2014/092378 descreve uma composição imunogênica apresentando 13 diferentes conjugados polissacarídeo - proteína em que cada conjugado continha um polissacarídeo capsular isolado de 12 sorotipos selecionados do grupo que consiste nos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F, e os sorotipos 22F ou 33F.

[00014] A publicação do pedido chinês n° CN 101590224 descreve uma vacina de conjugado pneumocócico polissacarídeo-proteína de valência 14 contendo os sorotipos 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F.

[00015] A publicação do pedido chinês n° CN

104069488 descreve um conjugado polissacarídeo-proteína de valência 14 em que os 14 sorotipos eram 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F.

[00016] A publicação do pedido internacional n° WO 2016/207905 descreve uma vacina de conjugado pneumocócico multivalente compreendendo conjugados de CRM197 e pelo menos 14 polissacarídeos capsulares selecionados dentre os sorotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F.

[00017] A patente norte americana US 8,192,746 descreveu uma composição imunogênica de valência 15 compreendendo polissacarídeos capsulares dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F conjugados ao CRM197.

[00018] A publicação do pedido internacional n° WO 2013/191459 descreve uma composição de valência 15 compreendendo polissacarídeos capsulares de sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F de *S. pneumoniae*.

[00019] A publicação do pedido chinês n° CN 103656632 descreve uma composição de polissacarídeo capsular pneumocócico multivalente contendo os sorotipos 6A e pelo menos um sorotipo extra selecionado do grupo que consiste em 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F os quais forneceram proteção contra 24 diferentes sorotipos pneumocócicos.

[00020] A publicação do pedido chinês n° CN 103656631 descreve uma composição de conjugado pneumocócico

capsular polissacarídeo-proteína multivalente compreendendo polissacarídeos capsulares de pneumococos de 24 diferentes sorotipos, a saber, 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F.

[00021] A publicação do pedido de patente norte americano nº US 2016/0324950 descreve conjugados imunogênicos polissacarídeo-proteína compreendendo um polissacarídeo capsular (CP) de *Streptococcus agalactiae*, também referido como *Streptococcus* do grupo B (GBS) e uma proteína carreadora, em que o CP é selecionado do grupo que consiste nos sorotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX. Este foi feito para o tratamento de diabetes mellitus crônica, câncer, insuficiência cardíaca, condições neurológicas e urológicas. Os conjugados de polissacarídeo capsular - proteína carreadora variaram.

[00022] A patente norte americana nº US 5,360,897 descreve conjugado imunogênico compreendendo um produto da aminação redutora de um polímero capsular intacto do patógeno bacteriano de *S. pneumoniae* apresentando pelo menos dois grupos carbonil e uma toxina ou toxoide bacteriano, o referido conjugado compreendendo um conjugado reticulado no qual existe uma ligação covalente direta entre o polímero capsular e a toxina ou toxoide.

[00023] A patente norte americana nº US 7,862,823 descreve uma composição de vacina de conjugado multivalente com pelo menos duas diferentes proteínas carreadoras.

[00024] A patente norte americana nº US 8,808,708 descreve uma composição imunogênica de valência 13 que

consiste em conjugados polissacarídeo - proteína em que os sorotipos consistem em 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F e em que a proteína carreadora é CRM197.

[00025] A publicação do pedido de patente norte americano nº US 2009/0017059 descreve uma composição imunogênica em que os sorotipos 19A e 19F foram conjugados a diferentes toxoides bacterianos.

[00026] A publicação do pedido internacional nº WO 2011/110241 descreve composições ou vacinas imunogênicas de conjugado pneumocócico em que diferentes químicas de conjugação foram usadas para diferentes componentes da composição imunogênica ou vacina. A aminação redutora foi usada para a conjugação de pelo menos um sorotipo e uma conjugação além da aminação redutora foi usada para a conjugação de diferentes sorotipos. O método de conjugação selecionado para os diferentes sorotipos permitiu que cada sorotipo fosse apresentado usando um método de conjugação que permitiu a melhor apresentação do epítipo do sacarídeo. Alguns sacarídeos pneumocócicos foram conjugados usando aminação redutora, enquanto outros sacarídeos pneumocócicos foram conjugados de forma diferente para permitir que a estrutura do anel permanecesse inquebrável e fornecesse melhores resultados.

[00027] A patente norte americana nº US 7,955,605 descreve um processo de fabricação de um conjugado de proteína carreadora-polissacarídeo que consiste no sorotipo 19A em que o polissacarídeo do sorotipo 19A ativado e a proteína carreadora são ressuspensos em dimetil sulfóxido (DMSO) para formar um conjugado.

[00028] A publicação do pedido de patente norte americano nº US 2010/0074922 descreve uma composição imunogênica contendo 10 ou mais sorotipos em que o sacarídeo capsular 19F é conjugado ao toxoide da difteria (DT), o sacarídeo capsular do sorotipo 18C é conjugado ao toxoide do tétano e os sacarídeos capsulares dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F são conjugados à proteína D de *Haemophilus influenza*.

[00029] A publicação do pedido de patente norte americano nº US 2010/0239604 descreve uma composição compreendendo conjugados multivalente de sacarídeo capsular de *S. pneumoniae* em que o sorotipo 19A é conjugado a um primeiro toxoide bacteriano e 19F é conjugado a um segundo toxoide bacteriano e os sacarídeos capsulares 2 - 9 do *S. pneumoniae* são conjugados à proteína D.

[00030] Além de aumentar o escopo da proteção através do desenvolvimento de vacinas que oferecerão proteção contra um maior número de sorotipos, os esforços foram concentrados no desenvolvimento de novos métodos de síntese.

[00031] A patente norte americana nº. US 7,709,001 descreve um método de síntese de conjugado de proteína carreadora de polissacarídeo capsular o qual consiste em: 1) reagir o polissacarídeo purificado com um ácido brando resultando na redução do tamanho; 2) reagir o polissacarídeo da etapa 1 com um agente oxidante na presença de cátions bivalentes resultando em um polissacarídeo ativado; 3) fazer o composto do polissacarídeo ativado com uma proteína carreadora; 4)

reagir o polissacarídeo ativado da etapa 3 e a proteína carreadora com um agente de redução para formar um conjugado de polissacarídeo - proteína carreadora; e 5) limitar aldeídos não reagidos no produto da etapa 4 para produzir um conjugado imunogênico de polissacarídeo - proteína carreadora.

[00032] A publicação do pedido internacional nº WO 2014/097099 descreve um método de síntese de um conjugado de proteína carreadora, o qual envolve: a) reagir um sacarídeo com 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) e N-cloro succinimida (NCS) em um solvente aquoso para produzir um sacarídeo ativado; e b) reagir o sacarídeo ativado com uma proteína carreadora compreendendo um ou mais grupos amina.

[00033] A publicação do pedido de patente norte americano nº 2012/321658 descreve uma composição imunogênica em que os sorotipos 1, 3, 19A e 19F ligados à proteína carrega tanto diretamente ou indiretamente através de uma química que não seja a aminação redutora e um ou mais diferentes sacarídeos é / são selecionados a partir de um segundo grupo que consiste dos sorotipos 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C e 23F o qual é/está ligado a um carreador de proteína por aminação redutora.

[00034] Vacinas pneumocócicas estão baseadas em 1) vacina de polissacarídeo pneumocócico e 2) vacina de conjugados pneumocócicos. PNEUMOVAX® vendido pela Merck compreende polissacarídeos não conjugados que pertencem aos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18e, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F. Crianças e

jovens respondem de forma fraca aos polissacarídeos mais pneumocócicos. A imunogenicidade dos imunógenos fracos é melhorada pela conjugação com as proteínas carreadoras. As vacinas de conjugado polissacarídeo - proteína são feitas usando polissacarídeos capsulares ligados a carreadores de proteína. O conjugado induz uma resposta imunológica melhorada dependente de células T contra o sorotipo específico.

[00035] Os conjugados são sintetizados usando diversos reagentes, tais como ligantes homo bifuncionais, hetero bifuncionais de comprimentos variados. Três vacinas de conjugados pneumocócicos estão disponíveis no mercado, PREVNAR®, SYNFLORIX® e PREVNAR-13®. A PREVNAR® é uma vacina heptavalente que contém os polissacarídeos capsulares dos sorotipos 4, 6B, 9Y, 14, 18C, 19F e 23F, cada um conjugado a uma proteína carreadora denominada CRM197. A SYNFLORIX® é uma vacina decavalente da GSK Biologicals que incorpora dez polissacarídeos capsulares conjugados à proteína D de NTHi oferecendo cobertura contra três cepas pneumocócicas adicionais, os sorotipos 1, 5 e 7F. A PREVNAR-13® é uma vacina tridecavalente contendo 13 polissacarídeos capsulares preparados a partir de treze sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9Y, 14, 18C, 19 A, 19F e 23F) conjugados a uma proteína carreadora denominada CRM197.

[00036] O aumento da resistência microbiana aos antibióticos e o número crescente de pessoas imunocomprometidas têm exigido o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas com proteção ainda mais ampla, o que leva ao

desenvolvimento de vacinas multivalentes eficazes contra o número crescente de sorotipos, especialmente para a cobertura da doença pneumocócica devido a sorotipos não encontrados na PREVNAR-13®. A necessidade de um sorotipo específico depende da região e da resistência aos antibióticos desenvolvida. Assim, a patente norte americana US 8192746 reporta uma composição imunogênica multivalente apresentando 15 conjugados polissacarídeo - proteína distintos. Cada conjugado consiste em um polissacarídeo capsular preparado a partir do sorotipo do *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9\1, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F ou 33F) conjugado a uma proteína carreadora CRM197. Existe uma necessidade por vacinas que induzem uma resposta imune contra o sorotipo 15B, 15C e 15A.

[00037] Com o aumento do número de antígenos de polissacarídeo na formulação multivalente de vacinas conjugadas, o teor de proteína carreadora aumenta. Este aumento leva a um aumento da resposta imune para a proteína carreadora, o que pode causar uma sobrecarga sistêmica.

[00038] Então, existe uma necessidade em desenvolver uma vacina pneumocócica que fornece proteção contra o aumento do número de sorotipos. Embora uma vacina de valência mais alta seja altamente desejável com uma conjugação, preferencialmente a resposta imune para a proteína carreadora é também reduzida. No desenvolvimento das vacinas multivalente que estendem o escopo de proteção para os sorotipos adicionais, existe uma necessidade de melhorar a imunogenicidade e a avidéz da vacina de conjugado para acomodar o número aumentado de sorotipos sem

comprometer as respostas imunes para todos, o que não é possível com os métodos de conjugação convencional. Em adição à proteção contra o aumento do número de sorotipos, existe também a necessidade de desenvolver novos ligantes para a conjugação para melhorar a resposta imune mesmo com o aumento do número de sorotipos bem como uma diminuição na resposta da proteína carreadora (e também evitar o impedimento estérico).

[00039] Embora muitas referências recitem a eficácia das vacinas atualmente disponíveis, quando há a adição de múltiplos novos sorotipos, a resposta imune diminui com o aumento no número dos sorotipos originais. Os sorotipos adicionais são necessários para aumentar a eficácia da resposta imune. Em adução, a maior eficácia deve preferencialmente incluir uma redução da resposta imune para a proteína carreadora. Então, permanece uma grande necessidade por vacinas de conjugado pneumocócico de valência mais alta para fornecer uma barreira contra infecções ao redor do mundo.

Sumário da invenção

[00040] A presente invenção supera os problemas e desvantagens associadas com as estratégias e desenhos atuais e fornece novas composições imunogênicas compreendendo sacarídeos capsulares conjugados e usos dos mesmos.

[00041] Uma concretização da invenção está direcionada para vacinas de conjugados multivalentes de *S. Pneumoniae* compreendendo dois grupos de conjugados, em que o grupo um compreende conjugados de polissacarídeo capsular

bacteriano monovalente e o grupo dois compreende conjugados multivalentes contendo conjugados de polissacarídeo capsular bacteriano bivalente apresentando reatividade cruzada. Preferencialmente, os conjugados do grupo um são compostos de conjugados de polissacarídeo capsular monovalentes de um ou mais sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 24F, 33F e 35B de *S. Pneumoniae*. Preferencialmente, os conjugados do grupo dois são compostos de um conjugado de polissacarídeo capsular bivalente ou multivalente de sorotipos de reação cruzada de um, dois ou mais sorotipos 6A / 6B / 6C / 6D de *S. Pneumoniae*, um, dois ou mais sorotipos 9V / 9N / 9A / 9B de *S. Pneumoniae*, um, dois ou mais sorotipos 15B / 15A / 15C de *S. Pneumoniae* ou sorotipos 19A / 19F *S. Pneumoniae*; e proteínas carreadoras. Preferencialmente, o segundo grupo constituindo uma vacina de conjugado multivalente de *S. Pneumoniae* que compreende conjugados multivalente de *S. Pneumoniae* de sorotipos de reação cruzada em que os conjugados são bivalentes unimoleculares e são derivados de polissacarídeos capsulares bacterianos. Preferencialmente, a vacina compreende polissacarídeos capsulares de dois sorotipos de reação imunologicamente cruzada conjugados à mesma proteína carreadora sequencialmente ou ao mesmo tempo. Preferencialmente, conjugados monovalentes de polissacarídeo capsular bacteriano do primeiro ou segundo grupo são sintetizados a partir de polissacarídeos capsulares bacterianos nativos com peso molecular que varia de 10 KDa a 50 KDa, 30 KDa a 100 KDa ou 100 KDa a 300 KDa.

[00042] Preferencialmente, o polissacarídeo capsular

bivalente de dois sorotipos de reação imunologicamente cruzada é representado pela fórmula PS1 - proteína carreadora - PS2 e, também preferencialmente, o conjugado compreende 6APS-CRM197-6BPS. Preferencialmente, a proteína carreadora compreende toxoide de tétano, toxoide de difteria, CRM197, fragmentos de toxoide de tétano (TTHc), proteína *N. meningitidis* PorB, proteínas do vírus RSV, proteínas de *B. Pertussis*, toxoide de Pertussis (PT), toxina adenilato ciclase (ACT), proteína de 69 KDa, antígenos da proteína viral do papiloma vírus humano, formas VLP do papiloma vírus humano, antígeno do núcleo do vírus hepatite B, formas VLP do vírus da hepatite B, derivados de HbsAg e / ou combinações dos mesmos. Preferencialmente, uma única dose de conjugados bivalentes de polissacarídeo de reação cruzada compreende menos do que 4 microgramas em comparação com os conjugados monovalentes das mesmas duas vacinas de polissacarídeo as quais são 4 microgramas ou mais.

[00043] Preferencialmente, a quantidade de proteína carreadora total na vacina de conjugado multivalente é significativamente menor do que a quantidade usada nos mono conjugados dos polissacarídeos individuais dos mesmos sorotipos de reação cruzada. Preferencialmente, as vacinas da presente invenção, a quantidade de proteína carreadora sendo conjugada a um polissacarídeo bivalente de reação cruzada apresenta menos proteína por sorotipo em comparação àquele dos conjugados monovalentes dos mesmos dois polissacarídeos, assim, a resposta imune da proteína carreadora gerada pela vacina é menor do que a resposta à

proteína carreadora das vacinas feitas por outros contendo os mono conjugados dos polissacarídeos individuais. Preferencialmente, o teor de proteína carreadora total na vacina de conjugado multivalente é de 0,5 a 0,7 % em peso dos mono conjugados dos polissacarídeos individuais dos mesmos sorotipos de reação cruzada (o qual está na proporção de 1:1 entre PS:proteína carreadora). Preferencialmente, a vacina de conjugado ainda compreende pelo menos um adjuvante selecionado do grupo que consiste de alumínio ou um sal de alumínio, fosfato de cálcio, um lipossoma de monofosforil lipídio A (MPLA), saponina QS - 21 e/ou um potente agonista TLR7/8. Preferencialmente, o pelo menos um adjuvante compreende um adjuvante de alumínio selecionado do grupo que consiste em fosfato de alumínio, sulfato de alumínio e hidróxido de alumínio. Preferencialmente, os polissacarídeos bacterianos são selecionados a partir do grupo que consiste de dois ou mais sorotipos de reação cruzada a partir de diferentes polissacarídeos capsulares bacterianos e/ou os polissacarídeos bacterianos compreendem: *S. pneumoniae*, *H. influenza* tipo a e/ou b; *S. pneumoniae*, *Streptococcus* do grupo B, e/ou *N. meningitidis*. Preferencialmente, os polissacarídeos capsulares compreendem polissacarídeos derivado a partir de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *N. meningitis*, *Streptococcus* do grupo B ou lipo oligossacarídeos de *Moraxella catarrhalis* (LOS). Também preferencialmente, o polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* é de reação imunoquimicamente reativa com os

sorotipos selecionados a partir do grupo que consiste em 6A / 6B / 6C / 6D; 9V / 9A / 9B.9N; 15A / 15B; 19A / 19F e tipos similares de polissacarídeos de reação cruzada. Preferencialmente, o polissacarídeo capsular é derivado dos sorotipos a / b / c / d / e / f de *Haemophilus influenzae*, polissacarídeos de *Haemophilus influenzae* não tipáveis (NTHi) e / ou lipo oligossacarídeos de *Moraxella catarrhalis* (LOS) ou sorotipos A, B, C, Y, W-135 ou X de *N. meningitis*, ou sorotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e N de *Streptococcus* do grupo B e sorotipos A, C, Y, X e W-135 de *N. meningitis*.

[00044] Outra concretização da invenção está direcionada para as vacinas de conjugado para o tratamento ou prevenção da infecção por patógenos gram positivo e gram negativo compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz da vacina de conjugado da invenção e, opcionalmente, um carreador farmacologicamente aceitável. Preferencialmente, os polissacarídeos capsulares são derivados de *Haemophilus influenzae*, *N. meningitis*, *Streptococcus* do grupo B, *N. meningitis*, *H. influenzae*, lipo oligossacarídeos de *Moraxella catarrhalis* (LOS) e combinação dos mesmos.

[00045] Outra concretização da invenção está direcionada para métodos para o acoplamento de polissacarídeos com proteínas carreadoras compreendendo: a ativação do polissacarídeo; a ligação de um braço espaçador de comprimento definido de cerca de 2,0 - 40 Å para o polissacarídeo ativado e a ligação do polissacarídeo ativado ligado ao braço espaçador para uma proteína

carreadora.

[00046] Outra concretização da invenção está direcionada para os métodos de acoplamento de uma proteína carreadora com polissacarídeos compreendendo: a ativação da referida proteína carreadora, a redução do dissulfeto das proteínas carreadoras para criar grupos sulfidril, preferencialmente criando um grupo sulfidril usando 2-iminotiolano (2-IT), ligante bi funcional tipo SMPH; ligação de um braço espaçador de comprimento definido de 4 - 40 Å para a proteína carreadora ativada; e ligação do polissacarídeo para um braço espaçador ligado à proteína carreadora ativada. Preferencialmente, a proteína carreadora ativada é selecionada do grupo que consiste em material de reação cruzada (CRM197) obtido ou derivado de *C. diphtheria* ou CRM197 recombinante obtido ou derivado de *P. fluorescens* ou *E. coli*.

[00047] Outra concretização da invenção está direcionada aos ligantes bifuncionais que são homo bifuncionais ou hetero bifuncionais.

[00048] Outra concretização da invenção está direcionada para vacinas de conjugado multivalentes de *S. Pneumoniae* em que a proteína carreadora é material (CRM197) de reação cruzada obtido a partir da *C. diphtheria*, CRM197 recombinante obtida a partir da *P. fluorescens* ou CRM197 recombinante obtida a partir da *E. coli*.

[00049] Outras concretizações e vantagens da invenção estão apresentados, em parte, na descrição, que se segue, e em parte, pode ser óbvio a partir desta descrição, ou pode ser aprendido a partir da prática da invenção.

Descrição das figuras

[00050] A Figura 1A se refere a um espectro 1H-RMN do polissacarídeo capsular de tamanho reduzido do sorotipo 6A (500 MHz)- os dados de RMN mostram nenhuma perda de integridade estrutural comparada ao PS nativo.

[00051] A Figura 1B se refer a um espectro 1H-RMN do polissacarídeo capsular de tamanho reduzido do sorotipo 6B (500 MHz) - os dados de RMN mostram nenhuma perda de integridade estrutural comparada ao PS nativo.

[00052] A Figura 2A se refere a anticorpos específicos do polissacarídeo capsular (IgG total) usando procedimento de ensaio a base de múltiplos grânulos (polissacarídeos usados para estes conjugados estão na faixa de 10 - 50 KDa).

[00053] A Figura 2B se refere a anticorpos específicos do polissacarídeo capsular (IgG total) usando procedimento de ensaio a base de múltiplos grânulos em que os polissacarídeos estão na faixa de 200 - 300 KDa ou mais.

[00054] A Figura 2C se refere a conjugados bivalentes de anticorpos específicos do polissacarídeo capsular 6A e 6B (IgG total) usando procedimento de ensaio a base de múltiplos grânulos em que os polissacarídeos estão na faixa de 10 - 50 KDa e 200 - 400 KDa.

[00055] A Figura 3A se refere a um diagrama de fluxo da síntese de conjugados monovalentes.

[00056] A Figura 3B se refere a um diagrama de fluxo de ativação PS1 e PS2 com ligantes.

[00057] A Figura 4A se refere a um diagrama de fluxo da síntese de conjugados bivalentes unimoleculares e

conjugados bivalentes.

[00058] A Figura 4B se refere a acoplamentos químicos CRM.

[00059] A Figura 5 se refere ao CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridínio, cloreto cianurônico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina), brometo de cianogênio (CNBr)).

[00060] A Figura 6 se refere a uma tiolação do CRM197 como iminotiolo.

Descrição da invenção

[00061] O *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria gram positiva a qual pode causar doenças tais como pneumonia, bacteremia, meningite e otite média aguda. O *Pneumococcus* é encapsulado com um polissacarídeo quimicamente ligante o qual resulta na especificidade do sorotipo. Pelo menos 90 sorotipos pneumocócicos são conhecidos, dos quais cerca de 23 correspondem a 90 % das doenças invasivas. A proteção contra doenças pneumocócicas invasivas está relacionada ao anticorpo específico para o polissacarídeo capsular, a proteção é, desta forma, específica para o sorotipo.

[00062] Foi descoberto, de forma surpreendente, que vacina de conjugado multivalente de *S. Pneumoniae* compreendendo um ligante entre a proteína carreadora e o polissacarídeo para formar dois grupos de conjugados, em que o grupo um compreende conjugados monovalentes de polissacarídeo capsular bacteriano e o outro grupo compreende conjugados multivalentes de proteína carreadora fornecer resultados substancialmente melhorados.

Especificamente, os conjugados bivalentes e conjugados bivalentes unimoleculares são, preferencialmente, sintetizados pela reação entre a proteína carreadora e os ligantes bifuncionais ligados aos sorotipos de *S. Pneumoniae* de reação cruzada. Os resultados alcançados são substancialmente melhorados se comparados às vacinas contendo vacina de conjugado de *S. pneumoniae* multivalente contendo conjugados de polissacarídeo capsular bacterianos monovalentes com o mesmo número de sorotipos com uma conjugação direta entre os dois ao invés de um ligante.

[00063] Uma concretização da invenção está direcionada para vacinas de conjugado multivalente compreendida de conjugados bivalentes polissacarídeos - proteína com imunogenicidade melhorada. Os conjugados bivalentes com estrutura geral PS1-proteína carreadora-PS2 apresentam imunogenicidade mais alta quando comparado aos conjugados monovalentes similares em que PS1 e PS2 são dois polissacarídeos de diferentes sorotipos de patógenos bacterianos gram negativos e gram positivos. Pelo desenvolvimento de uma vacina de conjugado bivalente, a eficácia da vacina aumenta e a imunogenicidade do carreador é reduzida. A química aqui descrita aumenta substancialmente a imunogenicidade dos conjugados, ao mesmo tempo em que reduz o carregamento da proteína carreadora.

[00064] Outra concretização da invenção está direcionada para vacinas com polissacarídeos de pesos moleculares mais baixos e ligantes bifuncionais de braço mais longo, preferencialmente, com imunogenicidade melhorada. Outra concretização da invenção está

direcionada para fornecer imunogenicidade e avidéz mais alta dos conjugados bivalentes bem como imunogenicidade da proteína carreadora mais baixa. Outra concretização da invenção está direcionada para reduzir a dose da vacina de conjugado com imunogenicidade mais alta.

[00065] Tais como aqui descritos, quatro parâmetros foram introduzidos para minimizar as desvantagens das vacinas convencionais:

- O tamanho do polissacarídeo é preferencialmente de 10 - 50 KDa.

- Os polissacarídeos de reação cruzada são conjugados ao mesmo tempo a proteínas carreadoras.

- Dois ou mais sorotipos de reação cruzada são conjugados ao mesmo tempo a proteínas carreadoras.

- Um braço espaçador hetero ou homo bifuncional longo, preferencialmente de 2 - 40 Å (também 2 - 40 Å, 4 - 40 Å, 10 - 40 Å, 20 - 40 Å, 9 - 20 Å, 5 - 20 Å, 5 - 30 Å).

[00066] Estes quatro parâmetros tomados juntos são profundamente eficazes para aumentar a proporção dos conjugados polissacarídeo/proteína, para reduzir o carregamento de proteína carreadora e para fornecer muitas vezes de aumento na imunogenicidade e avidéz.

[00067] A presente invenção está direcionada aos conjugados polissacarídeo-proteína com imunogenicidade melhorada que mostram títulos de anticorpo significativamente altos. A proteína carreadora é obtida a partir de, por exemplo, toxoide de tétano, toxoide da difteria, CRM197, fragmentos do toxoide de tétano (TTHc), proteína PorB de *N. meningitidis*, proteínas do vírus RSV,

proteínas de *B. Pertussis* tal como o toxoide da coqueluche (PT), toxina adenilato ciclase (ACT), proteína 69 KDa e antígenos da proteína do papiloma vírus humano ou sua forma VLP, antígeno do núcleo da hepatite B ou sua forma VLP ou derivados do HBsAg e outros carreadores convencionais. Fragmentos de polissacarídeo são obtidos a partir do grupo de bactérias gram positivas e bactérias gram negativas, preferencialmente de polissacarídeos de reação imunologicamente cruzada de *S. Pneumoniae*. A presente invenção também está direcionada para um processo para o preparo de conjugados polissacarídeo - proteína nos quais a proteína carreadora reage com fragmentos de polissacarídeo clivado e despolimerizado de tamanho de cadeia ótimo.

[00068] Composições imunogênicas da presente invenção fornecem um nível adequado e uma melhor proteção contra sorotipos de *S. pneumoniae* não encontrados em PREVNAR-13® e SYNFLORIX-10®.

[00069] Conjugados bivalentes com polissacarídeos de reação cruzada de sorotipos de *S. Pneumoniae* (6A / 6B, 9V / 9N, 15A / 15B e 19A / 19F e sorotipos de reação cruzada similares) com tamanho molecular de cadeia curta (10 - 50 KDa) foram usados para preparar uma vacina de conjugado de CPS pneumocócico de 16 - 26 valências no presente estudo. Os polissacarídeos de *Pneumococcus* tipo 6A e 6B foram usados como o modelo de CPSs de reação cruzada. A CRM197 foi usada como a proteína carreadora para esta aceitação clínica.

[00070] Monoconjugados multivalentes foram também preparados usando polissacarídeos de comprimento de cadeia

mais curto (0 - 50 KDa), braço espaçador longo (9 - 40 Å) com ligante PEG homo ou hetero bifuncional ou sem PEG com proteína carreadora CRM197.

[00071] Os CPS foram ativados tanto por oxidação ou por cianilação química e oxidados por periodato de sódio e introduzidos tanto com grupos aldeído ou isotiocianato (-OCN) reativos em CPS.

[00072] Duas estratégias (ligantes curtos e longos, CPSs curtos e longos) foram usadas para a introdução, respectivamente. As características físico-químicas e imunológicas das vacinas de conjugados bivalentes foram, então, investigadas independentemente ou em combinação com a formulação de conjugado multivalente.

[00073] Os exemplos a seguir ilustram as concretizações da invenção, porém não devem ser vistos como limitantes do escopo da invenção.

Exemplos

Exemplo 1 - Redução do tamanho do polissacarídeo, processo de ativação e conjugação para múltiplos sorotipos de *S. pneumoniae* 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F e 35B

- Polissacarídeo 6A e 6B

[00074] 100 mg de cada um dos polissacarídeos capsulares de *S. pneumoniae* 6A e 6B são dissolvidos em 10 ml de solução aquosa contendo 10 mM de ácido acético ou 0.1 M de HCl em pH 2.5 - 3.0 e a hidrólise é realizada pela manutenção da solução em uma temperatura de 60 - 85 °C por um período de 60 - 120 minutos. Os oligossacarídeos assim

obtidos após a neutralização, são diafiltrados usando 3 - 10 KDa de filtros TFF Centricon. Na análise de ¹H NMR (Figuras 1A e 1B), os oligossacarídeos formados não mostraram perda de integridade estrutural ou perda de epítomos ou estrutura da unidade de repetição. Os polissacarídeos foram medidos usando o ensaio Anthrone e a distribuição dos tamanhos moleculares (KDa) obtidos estão na faixa de 10 - 50 KDa, 30 - 100 KDa e 100 - 300 KDa.

[00075] Uma porção de CPS (50 mg) (polissacarídeos nativos de tamanho entre \geq 200 - 500 KDa ou polissacarídeos de tamanho reduzido de tamanho entre 10 - 50 KDa) foram ativados por reagentes de cianilação comumente usados em processos de ativação (Tabela 1). As distribuições do tamanho molecular dos polissacarídeos foram determinadas usando SEC - HPLC (Shodex SB - 405 e colunas SB - 406 SEC) com análise usando mistura de Pollulan (10 - 1000 KDa) como padrão de referência (padrões Pollulan de Shodex, USA).

[00076] O braço espaçador curto foi introduzido ao PS por reação com excesso molar de 5 a 8 vezes de ADH (Sigma) em pH 5.6 - 6.0 por 3 - 5 horas. O braço espaçador longo (ligante bifuncional ou ligante de 4 braços longo) foi introduzido no PS por reação com excesso molar de 5 a 10 vezes em pH 5.6 - 6.0 por 3 - 5 horas.

Tabela 1

Distribuição do tamanho do polissacarídeo (KDa) usado para a conjugação

Polissacarídeo	KDa do polissacarídeo
6A	10 - 30 KDa

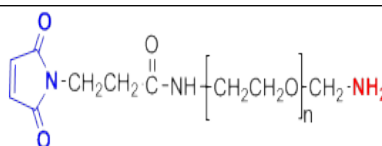
6B	20 - 50 KDa
15B	20 - 40 KDa
18C	20 - 50 KDa
22F	10 - 30 KDa

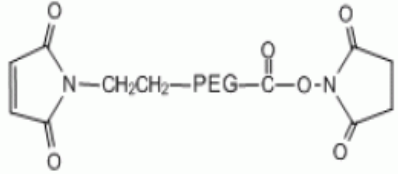
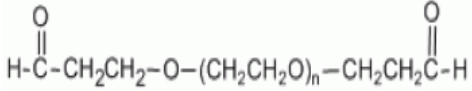
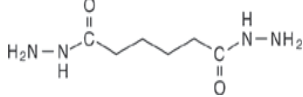
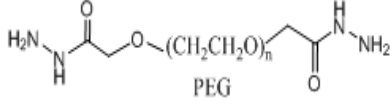
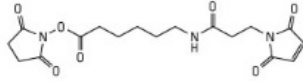
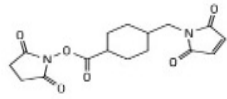
[00077] O PS ativado é ainda derivatizado com ligante de braço curto (di hidrazida de ácido adípico, ADH, 174,2 g / mol), mais um ligante de braço espaçador com tamanhos variados de 2 - 4 Å a 8 - 20 Å (600 g/mol - 3.5 g/mol).

[00078] Ligantes de PEG homo ou hetero bifuncional com grupos funcionais diamina ligados, por exemplo, NH₂-PEG0.6K-NH₂, NH₂-PEG3.5K-COOH (Tabela 2).

Tabela 2

Ligantes de cadeia curta e longa usados para a derivatização de polissacarídeo ou proteína carreadora (diversos outros ligantes tanto na forma peguilada ou na forma não peguilada foram também utilizados)

Número do ligante	Estrutura do ligante	Estruturas químicas / KDa ou Å utilizado
1	NH ₂ -PEG-NH ₂ / NHS	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 1K e 3.5K
2	NHS / NH ₂ -PEG- -COOH	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{PEG}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$ 1K e 3.5K
3	Mal-PEG-NH ₂	 1K e 3.5K

4	Mal-PEG-NHS	 <p>1K e 3.5K</p>
5	CHO-PEG-CHO	 <p>1K e 3.5K</p>
6	SH-PEG-NH2	$\text{HS}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ <p>1K e 3.5K</p>
7	ADH	
8	HZ-PEG-HZ	 <p>PEG</p>
9	SMPH	 <p>SMPH</p> <p>Succinimidil 6-[(beta - maleimidopropionamido) hexanoato] MW 379.36</p> <p>Braço espaçador 14.2 Å</p>
11	SMCC	 <p>SMCC</p> <p>Succinimidil 4-[(N - maleimidometil) ciclohexano - 1 - carboxilato] MW 334.32</p>

		Braço espaçador 8.3 Å
12	4-Braço-PEG-NH ₂ ou NHS	

Mal - Maleimida, **NHS** - Succinimida, **PEG** - derivados de polietileno glicol, **ADH** - di hidrazida de di hidrazida de ácido adípico.

[00079] Duas alíquotas de 2 ml cada do CPS derivatizado (10 mg / ml) foram misturadas com 1 ml da alíquota das duas amostras de proteína CRM197 (10 mg / ml) a 4 °C por 8 - 12 horas. Os conjugados com braço espaçador longo e curto foram purificados por filtros Centricon de 100 - 300 KDa (EMD Millipore) (Tabela 3).

Tabela 3

Caracterização físico-química de conjugados monovalentes

PS	PS KDa ativado por SEC - HPLC	Conjugado KDa por SEC - HPLC	Proporção PS:proteína	% de PS livre
6A	10 - 30 KDa, 200 - 300 KDa	> 200 - 300, > 2500	0,5 - 2, 1:2	< 2
6B	20 - 50 KDa, 200 - 400 KDa	> 300 - 500, > 2500	0,5 - 2, 1:2	< 1
15B	20 - 40 KDa	> 300 - 500	0,5 - 2, 1:1	< 1
18C	20 - 50 KDa	> 300 - 500	0,5 - 2, 1:1	< 2
22F	10 - 30 KDa	> 200 - 300	0,5 - 2, 1:1	< 1

Nota: Padrão interno para a determinação de KDa de PS para

SEC - HPLC: mistura de padrão Pullulan (2 KDa - 2500 KDa).

Exemplo 2 - Ativação dos polissacarídeos de tamanho reduzido de diferentes pesos moleculares

- Oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares sintetizados tal como descrito no exemplo 1 foram ativados. Os reagentes de cianilação comumente usados no processo de ativação.

[00080] CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil aminopiridínio (Sigma Aldrich, USA)), cloreto cianúrico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina) ou brometo de cianogênio (CNBr) e proteína carreadora de acoplamento (vide Figuras 5 e 6).

[00081] A solução de polissacarídeo (10 mg/ml) foi incubada com 10 mg/ml de CDAP (100 mg/ml em acetonitrila) em 2M de NaCl ou 200 - 300 mM de tampão de bicarbonato em temperatura ambiente por 4 - 6 minutos. O pH foi mantido a 10 - 10.5 usando tanto 1N de NaOH ou 1N de HCl. Então, o pH foi ajustado a 8.1 - 8.2, ligantes peguilados (Hz-PEG-HZ) foram permitidos reagir com CDAP tratado com OS por 8 - 12 horas em temperatura ambiente. As misturas reacionais foram filtradas em profundidade seguida por filtros de corte Centricon 100 - 300 KDa por 5 - 8 vezes usando 150 mM de NaCl.

- Derivatização de polissacarídeos de tamanho reduzido ativados

[00082] Os Oligossacarídeos ativados foram ainda derivatizados com ligante de hidrazida de cadeia curta homo bifuncional. O reagente típico foi di hidrazida de ácido adípico, ADH, peso molecular 174.2 g/mol). Ligantes de PEG

homo ou hetero bifuncionais sustentando grupos funcionais diaminas, di hidrazidas ou amina ou hidrazida - ácido carboxílico / aldeído, por exemplo NH₂-PEG(1K-3.5K)-NH₂, HZ-PEG(1-3.5K)-HZ, NH₂-PEG3.5K-COOH foram usados. (Tabela 2). Diversos outros braços espaçadores homo ou hetero bifuncionais podem também ser usados para a derivatização (Tabela 2). O braço espaçador curto foi introduzido ao oligossacarídeo pela reação com excesso molar de 5 a 8 vezes de di hidrazida de ácido adípico (Sigma) em pH 5.8 - 6.0 por 3 - 5 horas. O ligante de cadeia longa (ligante bifuncional ou ligante tetra funcional longo (Tabela 2), ligante de 4 braços nº 12) foi introduzido no polissacarídeo por reação com excesso molar de 5 a 10 vezes do ligante para o oligossacarídeo em pH 5.8 - 6.0 por 3 - 5 horas em temperatura ambiente.

- Derivatização da proteína carreadora com ligantes curtos ou longos

[00083] A proteína carreadora CRM197 foi ainda derivatizada com ligante hidrazida homo bifuncional de cadeia curta. O reagente típico foi a di hidrazida de ácido adípico, ADH, peso molecular 174.2 g/mol). Ligantes de PEG homo ou hetero bifuncionais sustentando grupos funcionais diaminas, di hidrazidas ou amina ou hidrazida - ácido carboxílico / aldeído, por exemplo, NH₂-PEG(1K-3.5K)-NH₂, HZ-PEG(1-3.5K)-HZ, NH₂-PEG3.5K-COOH foram usados. (Tabela 2). Diversos outros braços espaçadores homo ou hetero bifuncionais podem também ser usados para a derivatização tal como listado na (Tabela 2). O braço espaçador curto foi introduzido à proteína carreadora CRM197 pela reação com

excesso molar de 5 a 8 vezes de di hidrazida de ácido adípico (Sigma) em pH 5.8 - 6.2 em 300 - 600 mM de tampão MES por 3 - 5 horas em temperatura ambiente. Ligantes de cadeia longa (ligante bifuncional ou ligante tetra funcional longo (Tabela 2, ligante de 4 braços nº 12) foi introduzido na proteína carreadora por reação com excesso molar de 5 a 10 vezes do ligante para o oligossacarídeo em pH 5.8 - 6.2 em 300 - 600 mM de tampão MES por 3 - 5 horas em temperatura ambiente.

Exemplo 3 - Sorotipos de polissacarídeo de reação cruzada, ativação e ligação de ligante de braço espaçador curto ou longo (sorotipos de interesse são 6A / 6B, 9V / 9N, 15A / 15B e 19A / 19F ou qualquer outro sorotipo de reação cruzada).

[00084] A ativação do oligossacarídeo derivado do polissacarídeo capsular de *S. Pneumoniae* tipo 6A e 6B com conjugação com CRM197 e introdução dos grupos amino primários aos oligossacarídeos ao mesmo tempo.

[00085] Os Polissacarídeos nativos ou de tamanho reduzido do sorotipo 6A e 6B ($\geq 200 - 400$ KDa) foram conjugados usando o mesmo procedimento tal como descrito nos Exemplos 1 e 2.

[00086] A mistura de oligossacarídeos então obtida tal como reportado no Exemplo 1 são dissolvidas em WFI, para uma concentração final de 10 mg/ml. Ao final da reação, os oligossacarídeos são purificados por diafiltração usando filtros Centricon de 3 - 10 KDa.

[00087] Os oligossacarídeos dentro dos quais os grupos amino foram introduzidos são diluídos para uma

concentração de 10 mg / ml em uma solução aquosa de DMSO (a 20 - 30% v / v) para o DMSO contendo ligante curto ADH ou ligantes de braço espaçador longo em excesso molar relativamente para os grupos amino introduzidos nos oligossacarídeos (usualmente 5 - 10:1). A reação foi realizada pela manutenção das soluções em temperatura ambiente por um tempo de 4 - 12 horas. No final do período, o oligossacarídeo foi novamente purificado usando filtros Centricon de 3 - 10 KDa.

Exemplo 4 - Síntese de conjugados monovalentes de polissacarídeos pneumocócicos

[00088] Duas alíquotas separadas de polissacarídeos de tamanho igual ou diferente reduzido e derivatizado de tamanho reduzido (com braço espaçador curto ADH e braço espaçador longo HZ-PEG-HZ) tal como sintetizado no exemplo 3 (10 mg / ml) foram misturados com uma alíquota de 1 ml da amostra de proteína CRM197 (10 mg / ml) a 4 °C por 8 - 12 horas. Os conjugados contendo ambos ligantes de cadeia curta e longa foram purificados usando filtros Centricon de 100 - 300 KDa (EMD Millipore). Cada conjugado monovalente foi avaliado para o teor de polissacarídeo total por ensaio de antrona ou ácido urônico, teor de proteína total por ensaio BCA ou Lowry (Tabela 4).

[00089] Todos os outros conjugados de polissacarídeos de reação cruzada são feitos usando o mesmo procedimento tal como descrito acima.

Tabela 4

Caracterização físico-química do conjugado bivalente de estrutura geral 6A-CRM197-6B

PS	KDa do oligossacarídeo ativado	KDa do conjugado	Proporção de oligossacarídeo: proteína (proporção em peso)	% de oligossacarídeo livre em peso
6A	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 200 - 300$ KDa, > 2500 KDa	$0.5 - 2,$ $1:2$	< 2
6B	$\geq 200 - 400$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 2500 KDa	$0.5 - 2,$ $1:2$	< 1
6C	$\geq 200 - 400$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 2500 KDa	$0.5 - 2,$ $1:2$	< 1
15B	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 1500 KDa	$0.5 - 2,$ $1:1$	< 1
15A	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 1500 KDa	$0.5 - 2,$ $1:1$	< 1
18C	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 1500 KDa	$0.5 - 2,$ $1:1$	< 2
22F	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 200 - 300$ KDa, > 1000 KDa	$0.5 - 2,$ $1:1$	< 1
1	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 200 - 300$ KDa, > 2500 KDa	$0.5 - 2,$ $1:2$	< 2

3	$\geq 200 - 400$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 2500 KDa	$0.5 - 2,$ 1:2	< 1
4	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 1500 KDa	$0.5 - 2,$ 1:1	< 1
7F	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 1500 KDa	$0.5 - 2,$ 1:1	< 2
9V	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 200 - 300$ KDa, > 1000 KDa	$0.5 - 2,$ 1:1	< 1
9N	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 200 - 300$ KDa, > 1000 KDa	$0.5 - 2,$ 1:1	< 1
14	$> 100 - 300$ KDa	$> 200 - 300$ KDa, > 2500 KDa	$0.5 - 2,$ 1-2	< 2
18C	$\geq 200 - 400$ KDa	> 800 KDa, > 2500 KDa	$0.5 - 2,$ 1-2	< 1
19A	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 1500 KDa	$0.5 - 2,$ 1:1	< 1
19F	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 300 - 500$ KDa, > 1500 KDa	$0.5 - 2,$ 1:1	< 2
23F	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 200 - 300$ KDa, > 1000 KDa	$0.5 - 2,$ 1:1	< 1

33F	$\geq 100 - 300$ KDa	$> 200 - 300$ KDa, > 2500 KDa	$0.5 - 2,$ 1:2	< 2
-----	-------------------------	---------------------------------------	-------------------	-------

Nota: Padrão interno para SEC - HPLC (KDa): mistura padrão de Pollulan (2 KDa - 1200 KDa)

Exemplo 4 - Formulação investigacional de vacina de conjugado pneumocócico de 16 valências ou valência mais alta

[00090] Conjugados de polissacarídeo pneumocócicos - CRM197 para os sorotipos contendo 1, 3, 5, 7F, 14, 15B, 18C, 22F, 23F, 33F, 35B e conjugados de polissacarídeo de reação cruzada 6A, 6B, 9V, 9N, 15A, 15B, 19A e 19F foram combinados para produzir uma concentração de antígeno final de 4.0 µg PS/mL. Solução de cloreto de sódio (150 mM), 10 - 20 mM de histidina, ácido succínico e 0,001 % de Tween 20 foram também usados durante o processo de formulação como diluentes e fosfato de alumínio (Adju-Phos, Brenntag, USA) foi usado como adjuvante investigacional. O conjugado 16-V foi assepticamente depositados em frascos estéreis de 2 mL. PNEUMOVAX® (Merck, USA) ou PREVNAR-13® (Pfizer, USA) foram usados como duas formulações de vacinas comerciais controle.

Exemplo 5 - Estudos de imunogenicidade dos conjugados

[00091] Um modelo de coelho branco New Zealand (NZW) foi selecionado neste trabalho para comparar a imunogenicidade dos conjugados pneumocócicos PS-CRM197. Os coelhos de todos os grupos (16-V {valência}, PREVNAR-13® e PNEUMOVAX®) foram examinados para sinais clínicos antes e depois dos períodos de imunização. Para todos os grupos, a

pré-imunização, dose de amplificação (dias 7 e 14) e hemorragia terminal (28 dias) foram coletados e aliquotados e armazenados a -80 °C até o uso. Ensaios de imunogenicidade multiplexada para a determinação de IgG total foram realizados de acordo com o protocolo padrão usando soro padrão de referência 007 (CBER, FDA, USA). O soro de referência e soro de coelho foram diluídos e pré-adsorvidos para anticorpos de reação cruzada por tratamento como CWPS pneumocócico e tanto 22F PS ou 25PS. Anticorpos anti-polissacarídeo monoclonais humanos (Pamlico Biopharma, USA) foram usados para estimar o IgG total. Bio-Plex 200 (Bio-Rad). O leitor Multiplex foi usado de acordo com as instruções do fabricante (vide Figuras 2A, 2B e 2C).

Exemplo 5 - Ativação e ligação de ligantes espaçadores curtos e longos de sorotipos de polissacarídeo capsular de reação cruzada de *S. Pneumoniae*

[00092] Os sorotipos de 6A / 6B, 9V / 9N, 15A / 15B e 19A / 19F os quais são sorotipos de reação cruzada são usados para a síntese de conjugados bivalentes contendo polissacarídeos capsulares e proteína carreadora. Os conjugados bivalentes por definição contêm dois polissacarídeos capsulares ligados ao CRM197 simultaneamente ou concomitantemente.

[00093] A ativação dos polissacarídeos de tamanho reduzido derivados do polissacarídeo capsular de *S. Pneumoniae* tipo 6A e 6B, a conjugação com CRM197 e a introdução dos grupos amino primário ou hidrazida aos oligossacarídeos ocorreu ao mesmo tempo.

[00094] Polissacarídeos nativos ou oligossacarídeos

de tamanho reduzido do sorotipo 6A e 6B ($\geq 200 - 500$ KDa) foram conjugados usando o mesmo procedimento tal como descrito no Exemplo 1 - 4.

[00095] As misturas de polissacarídeos de tamanho reduzido então obtidas foram dissolvidas em água por injeção, de modo que a concentração final foi de 10 mg / ml. Os polissacarídeos de tamanho reduzido dentro dos quais os grupos amino ou hidrazida foram introduzidos foram diluídos para uma concentração de 10 mg / ml em uma solução aquosa de dimetil sulfoxido (DMSO) de modo que a porcentagem de DMSO estava na faixa de 20 - 30 % (v / v). Isto foi adicionado ao DMSO contendo ligante de cadeia curta tal como ADH ou ligantes de cadeia longa tais como descritos na Tabela 2 em excesso molar relativamente aos grupos amino / hidrazida introduzidos nos polissacarídeos de tamanho reduzido (usualmente 5:1 ou 10:1), mais especificamente 8:1.

[00096] A reação foi realizada em temperatura ambiente por uma duração de 4 - 12 horas. Ao final do período de reação, o produto de reação foi, então, purificado usando filtros Centricon de 3 - 10 KDa.

Exemplo 6 - Conjugação simultânea ou concomitante de oligossacarídeos de *S. pneumoniae* do tipo 6A e tipo 6B com proteína carreadora CRM197 como produção de conjugados bivalentes.

[00097] A solução aquosa contendo 15 mg / ml de CRM197, foi adicionada ao DMSO contendo o ligante ligado ao oligossacarídeo (20 - 30 % em água) derivado do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* tipo 6A. A

proporção do ligante ligado ao oligossacarídeo para CRM197 foi selecionada dentre 1:1, 2:1, 1:2. A mistura então obtida foi mantida sob agitação leve, em temperatura ambiente por 8 - 12 horas. Ao final do referido tempo, a solução contendo o oligossacarídeo derivatizado derivado do polissacarídeo capsular de *S. Pneumoniae* 6B foi adicionado. A proporção molar de polissacarídeo capsular de *S. Pneumoniae* 6B para CRM197, foi selecionada a partir de 1:1, 2:1, 1:2. A mistura resultante foi mantida por 8 - 12 horas em temperatura ambiente (Tabela 5). A reação de conjugação também pode ser realizada pela adição, no mesmo tempo (concomitante), de uma solução contendo CRM197, o oligossacarídeo ativado respectivamente derivado do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* tipo 6A e do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* tipo 6B. Os conjugados oligossacarídeo - proteína então obtidos foram dializados usando membrana de diálise de 100 - 300 KDa (Spectrum lab, USA), condicionada em 0,01M de tampão fosfato contendo 0,2M de NaCl (pH = 6.6 - 7.0) e, por fim, filtradas através de um filtro de 0.22 µm.

[00098] Todos os outros conjugados de polissacarídeos de reação cruzada foram feitos usando o mesmo procedimento tal como usado acima. As sequências de reação são mostradas nas **Figuras 3A, 3B, 4A e 4B.**

Tabela 5

Comparações de conteúdos de PS

Oligossac arídeo bivalente	KDa de oligossaca rídeo	KDa de conjugado	Proporção em peso de polissacarídeo	% de oligoss acarídeo

	ativado		total:proteína	o livre em peso
6A - 6B	≥ 100 - 300	2.0:1.5	2 - 1.5 (1:0.75)	< 2
6A - 6B	≥ 100 - 300, ≥ 300	> 1200 - 2500 KDa	2 - 1.4 (1: 0.7)	< 3
19A - 19F	≥ 100 - 300	> 500 - 800 KDa	2 - 1.6 (1:0.8)	< 2
15A - 15B	≥ 100 - 300, ≥ 300	> 500 - 1000 KDa	2 - 1.3 (1: 0.65)	< 3
9V - 9N	≥ 100 -300, ≥ 300	> 500 - 1000 KDa	2 - 1.3 (1: 0.65)	< 3

Exemplo 7 - Formulação investigacional de vacina de conjugado pneumocócico de 18 valências ou mais.

[00099] Conjugados de polissacarídeo pneumocócico CRM197 para os sorotipos contendo 1, 3, 5, 7F, 14, 18C, 22F, 23F, 33F, 35B (10 sorotipos de polissacarídeos) e conjugados de polissacarídeo de reação cruzada (6A, 6B), (9V, 9N), (15A, 15B) e (19A, 19F) (8 sorotipos) foram combinados para produzir uma concentração de polissacarídeo final de 2,2 - 4,4 μg de PS / mL (1,1 - 2,2 μg / dose humana, 0.5 mL). Solução de cloreto de sódio (150 mM), 10 - 20 mM de histidina, 20 mM de HEPES ou tampão MOPS e 0,001 % de Tween 20 foram também usados durante o processo de formulação como diluente e fosfato de alumínio (Adju-Phos, Brenntag, USA) foi usado como adjuvante investigacional.

[000100] Conjugados de 18 valências ou valências mais

altas (> 20V - 24V) foram assepticamente depositados em frascos estéreis de 2 mL. PNEUMOVAX® (Merck, USA) e/ou PREVNAR-13® (Pfizer, USA) foram usados como controles.

Exemplo 9 - Estudos de imunogenicidade dos conjugados.

[000101] Um modelo de coelho branco New Zealand (NZW) foi selecionado neste trabalho para comparar a imunogenicidade dos conjugados pneumocócicos PS-CRM197. Os coelhos de todos os grupos (conjugados de 18 valências ou valências mais altas, PREVNAR-13®, Pfizer e PNEUMOVAX®-23 (Merck USA) foram examinados para títulos sorológicos antes e após os períodos de imunização. Para todos os grupos, a pré-imunização, dose de amplificação (dias 7 e 14) e hemorragia terminal (28 dias) foram coletados e aliqüotados e armazenados a -80 °C até o uso. Ensaios de imunogenicidade para a determinação do IgG total foram realizados de acordo com o protocolo padrão usando o soro padrão de referência 007 (CBER, FDA, USA). O soro de referência e soro de coelho foram diluídos e pré-adsorvidos para anticorpos de reação cruzada por tratamento como CWPS pneumocócico e sorotipo não vacinal 25PS. Anticorpos anti-polissacarídeo monoclonais humano / de coelho / de camundongo foram usados para estimar o IgG total. O leitor Bio-Plex 200 (Bio-Rad) foi usado de acordo com as instruções do fabricante.

[000102] A imunogenicidade dos conjugados, isto é, os anticorpos específicos do polissacarídeo capsular (IgG total) foi medida usando método de ensaio ELISA a base de grânulos. Os valores de IgG total foram fornecidos na Tabela 6 e foram comparados frente a frente com PREVNAR-13®

em dados de imunogenicidade em coelhos. Dados do dia 14 mostram o aumento significativo no título na vacina IVT - 18V - 1 quando comparada a vacina PREVNAR-13®. De forma similar, dados de IVT - 18V - 1 apresentam ampliação significativa nos valores de IgG quando comparado com o PREVNAR-13® (Tabela 6).

Tabela 6

Anticorpos específicos dos polissacarídeos capsulares (IgG total em µg / ml) usando ensaio ELISA a base de múltiplos grânulos para vacinas de conjugado monovalente 18V

PREVNAR -13® 2.2 µg / dose	(IgG) dia 14 / dia zero	(IgG) dia 28 / dia zero	IVT-18V-1 2.2 µg / dose	(IgG) dia 14 / dia zero	(IgG) dia 28 / dia zero
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	48	480
6A	188	560	6A	775	3775
6B	165	780	6B	662	3662
18C	50	280	18C	306	3560
19A	45	235	19A	233	2500
19F	29	290	19F	72	720
4	49	230	4	150	750
5	186	700	5	550	3550
7F	180	680	7F	332	3860
9V	52	520	9V	212	2400
9N	-	-	9N	200	2200
14	85	400	14	272	2890
15A	-	-	15A	672	3900

15B	-	-	15B	750	4000
18C	175	800	18C	550	5500
22F	-	-	22F	1000	8000
23F	53	450	23F	212	2420

[000103] Nota: IVT - 18V = vacina de conjugados 18-V (conjugados monovalentes misturados entre si); os sorotipos 9N, 15A, 15B, 22F e 23F são estão presentes no PREVNAR-13®, assim, os valores de IgG não foram medidos; formulação 18-V como conjugados monovalentes foram preparadas usando 2.2 µg para cada sorotipo exceto 4.4 µg de conjugado 6B. Solução de cloreto de sódio (150 mM), 10 - 20 mM de histidina, 20 mM de HEPES ou tampão MOPS e 0.001 % de Tween 20 foram também usados durante o processo de formulação como diluente e fosfato de alumínio (Adju-Phos, Brenntag, USA) foi usado como adjuvante investigacional; anticorpos de polissacarídeos capsulares (IgG total) usando ELISA a base de grânulos: formulação de vacina conjugada 18-V-2 (IVT - 18V - 2): formulação 10-V como conjugados monovalentes e 8 - V remanescente adicionada como conjugados bivalentes os quais incluem 6A / 6B, 9V / 9N, 15A / 15B e 19A / 19F. (dose de vacina usada como 2.2 µg para cada sorotipo exceto 4.4 µg de 6B) formulação 10-V como conjugados monovalentes e 8-V remanescentes adicionado como conjugados bivalentes os quais incluem conjugados bivalentes unimoleculares 6A / 6B, 9V / 9N, 15A / 15B e 19A / 19F. 6A - 6B são usados como 2.2 µg / dose, conjugados bivalentes remanescentes são usados como 2.2 µg / dose. Solução de cloreto de sódio (150 mM), 10 - 20 mM de histidina, 20 mM de HEPES ou tampão MOPS e 0.001 % de Tween 20 foram também usados durante o

processo de formulação como diluente e fosfato de alumínio (Adju-Phos, Brenntag, USA) foi usado como adjuvante investigacional.

[000104] A imunogenicidade dos conjugados, anticorpos específicos do polissacarídeo capsular (IgG total) foi medida usando método de ensaio ELISA à base de grânulos foram fornecidos na Tabela 7. Os valores de IgG total foram comparados frente a frente com PREVNAR-13® em dados de imunogenicidade em coelhos. Dados do dia 14 mostram o aumento significativo no título na vacina IVT-18V-2 quando comparada à vacina PREVNAR-13®. De forma interessante, os dados para IgG total de IVT-18V-2 para sorotipos de conjugados bivalentes (por exemplo, 6A / 6B, 9V / 9N, 15A / 15B e 19A / 19F) apresentou uma amplificação significativa nos valores de IgG quando comparado à formulação IVT - 18V - 1 com conjugados monovalentes. Sendo assim, pode ser concluído que os conjugados bivalentes apresentam melhor imunogenicidade em comparação aos conjugados monovalentes (Tabela 7). Sendo assim, a formulação de vacina conjugada IVT-18V-2 apresenta imunogenicidade superior não apenas contra PREVNAR-13® porém também contra a formulação IVT-18V-1. Os polissacarídeos conjugados com ligante 1-3.5K (HZ-PEG-HZ) elicitam uma imunogenicidade muito mais alta em comparação com ligante de cadeia curta (ADH) ou nenhum ligante de conjugado como em PREVNAR-13®.

Tabela 7

Anticorpos de polissacarídeos capsulares (IgG total) usando ELISA a base de múltiplos grânulos

PREVNAR-13® 2.2 µg / dose	Proporção dia 14 / dia 0	Proporção dia 28 / dia 0	IVT-18V-2 2.2 µg / dose	Proporção dia 14 / dia 0	Proporção dia 28 / dia 0
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	50	530
6A	188	560	6A / 6B	875 / 762	4375 / 4662
6B	165	780			
18C	50	280	18C	316	3600
19A	45	235	19A / 19F	300 / 198	3500 / 2700
19F	29	290			
4	49	230	4	180	1000
5	186	700	5	550	3600
7F	180	680	7F	360	4100
9V	52	520	9V / 9N	350 / 300	3400 / 3200
9N	-	-			
14	85	400	14	310	32000
15A	-	-	15A / 15B	872 / 850	5900 / 5600
15B	-	-			
18C	175	800	18C	600	6800
22F	-	-	22F	1020	8150
23F	53	450	23F	300	3200

[000105] Nota: 1VI - 18V - 2 = 10 conjugados

monovalentes e 4 conjugados bivalentes misturados entre si; 18-V formulação de vacina conjugada (IVT - 18V - 3): formulação 10-V como conjugados monovalentes usados como 2,2 µg / dose e 8-V remanescente adicionado como conjugados bivalentes os quais incluem 6A / 6B, 9V / 9N, 15A / 15B e 19A / 19F usados como 1.1 µg / dose, exceto 6B 2,2 µg / dose.

[000106] A imunogenicidade dos conjugados, isto é, os anticorpos específicos do polissacarídeo capsular (IgG total) foram medidos usando o método de ensaio ELISA a base de múltiplos grânulos. Os valores de IgG total foram fornecidos na Tabela 8 e foram comparados frente a frente com PREVNAR-13® em dados de imunogenicidade em coelhos. Dados do dia 14 mostram o aumento significativo no título da vacina IVT-18V-3 quando comparada à vacina PREVNAR-13®. De forma interessante, nas formulações IVT-18V-3 com menor dose (dose 2,2 vs 1,1 ug), os dados de IgG total para sorotipos de conjugados bivalentes (por exemplo, 6A / 6B, 9V / 9N, 15A / 15B e 19A / 19F) apresentam valores comparáveis de IgG quando comparados com formulações IVT - 18V - 2 para os sorotipos de conjugado bivalente. Sendo assim, pode ser concluído que os conjugados bivalentes apresentam melhor imunogenicidade em comparação a conjugados monovalentes em menor dose. Sendo assim, a formulação de vacina conjugada IVT-18V-2 apresenta imunogenicidade superior não apenas contra PREVNAR-13® porém também contra a formulação IVT-18V-1. Os polissacarídeos conjugados com ligante 1 - 3,5K (HZ - PEG - HZ) elicitam uma imunogenicidade muito maior quando

comparados com ligantes curtos (ADH) ou nenhum ligante de conjugado como em PREVNAR-13® (Tabela 8).

Tabela 8

Dados de IgG total para sorotipos de conjugados bivalentes

PREVNAR-13® 2,2 µg / dose	Proporção dia 14 / dia 0	Proporção dia 28 / dia 0	IVT-18V-2 2,2 µg / dose	Proporção dia 14 / dia 0	Proporção dia 28 / dia 0
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	50	530
6A	188	560	6A / 6B	825 / 860	4275 / 4900
6B	165	780			
18C	50	280	18C	316	3600
19A	45	235	19A / 19F	275 / 250	3400 / 3000
19F	29	290			
4	49	230	4	180	1000
5	186	700	5	550	3600
7F	180	680	7F	360	4100
9V	52	520	9V / 9N	320 / 380	3300 / 3800
9N	-	-			
14	85	400	14	310	32000
15A	-	-	15A / 15B	790 / 900	5800 / 6200
15B	-	-			
18C	175	800	18C	600	6800

22F	-	-	22F	1020	8150
23F	53	450	23F	300	3200

Nota: 1VI - 18V - 3 = 10 conjugados monovalentes e 4 conjugados bivalentes misturados entre si.

[000107] Outras concretizações e usos da invenção serão evidentes para um técnico no assunto a partir das considerações do relatório descritivo e prática da invenção aqui descrita. Todas as referências aqui citadas, incluindo todas as publicações, patentes e pedidos de patentes norte americanos e estrangeiros, estão especificamente e totalmente incorporados por referência. Está previsto que o relatório descritivo e os exemplos sejam considerados apenas exemplos, com o verdadeiro escopo da invenção sendo indicado pelas reivindicações a seguir. Além disso, o termo "compreendendo" inclui os termos "consistindo em" e "consistindo essencialmente em".

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica **caracterizado pelo** fato de compreender:

conjugados de primeiro e segundo grupos, em que:

os conjugados de primeiro grupo compreendem uma primeira coleção de conjugados monovalentes, em que cada conjugado monovalente compreende uma primeira proteína carreadora e um polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* e a primeira coleção inclui polissacarídeos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* dos serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 24F, 33F e 35B; e

os conjugados de segundo grupo compreendem uma segunda coleção de conjugados multivalentes e/ou bivalentes, em que cada conjugado multivalente ou bivalente compreende uma segunda proteína carreadora e pelo menos dois polissacarídeos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, selecionados a partir de um ou mais dos grupos consistindo dos serotipos 6A, 6B, 6C e/ou 6D de *Streptococcus pneumoniae*, serotipos 9V, 9N, 9A e 9B de *Streptococcus pneumoniae*, serotipos 15B, 15A, e 15C de *Streptococcus pneumoniae*, e serotipos 19A e 19F de *Streptococcus pneumoniae*, em que um ou mais dos polissacarídeos capsulares são acoplados por meio de um ligante bifuncional, em que o conjugado multivalente contém uma quantidade de proteína carreadora que é menor do que uma quantidade de polissacarídeo capsular.

2. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de os conjugados de segundo grupo serem conjugados bivalentes.

3. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de os conjugados bivalentes compreenderem dois sorotipos de reação imunologicamente cruzada e ser representado pela fórmula PS1-proteína carreadora-PS2, em que PS1 e PS2 representam polissacarídeos diferentes e proteína carreadora se refere a segunda proteína carreadora.

4. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de os conjugados bivalentes serem conjugados com a mesma proteína carreadora sequencialmente ou simultaneamente.

5. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de os conjugados de segundo grupo compreenderem conjugados bivalentes e os polissacarídeos capsulares dos conjugados bivalentes terem um peso molecular de 10 kDa a 50 kDa.

6. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de o ligante bifuncional adicionalmente compreender um braço espaçador de 9-40 Å.

7. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de a primeira proteína carreadora e/ou a segunda proteína carreadora compreender toxoide de tétano, toxoide de difteria, CRM197, fragmentos de toxoide de tétano (TTHc), proteína *N. meningitidis* PorB, proteínas do vírus RSV, proteínas de *Bordetella Pertussis*, toxoide de *Pertussis* (PT), toxina adenilato ciclase (ACT), antígenos da proteína viral do papiloma vírus humano, uma proteína de 69 KDa viral de

papiloma humano, formas VLP do papiloma vírus humano, antígeno do núcleo do vírus hepatite B, formas VLP do vírus da hepatite B, derivados de HBsAg e/ou combinações dos mesmos.

8. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de uma única dose compreender menos do que 4 microgramas.

9. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de a quantidade da primeira e segunda proteínas carreadoras ser de 0,5% a 0,8%, em peso, dos conjugados.

10. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de os conjugados do segundo grupo compreenderem conjugados bivalentes e os polissacarídeos capsulares dos conjugados bivalentes terem um peso molecular de 30 KDa a 100 KDa.

11. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de um ou mais dos conjugados monovalentes compreenderem um ligante.

12. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender pelo menos um adjuvante selecionado a partir do grupo que consiste em sal de alumínio, fosfato de cálcio, um lipossoma de monofosforil lipídio A (MPLA), saponina QS-21 e um potente agonista TLR7/8.

13. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** fato de o sal de alumínio ser selecionado a partir do grupo que consiste em fosfato de alumínio, sulfato de alumínio e hidróxido de alumínio.

14. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de a segunda coleção incluir serotipos 6A, 6B, 6C e 6D de *Streptococcus pneumoniae*, serotipos 9V, 9N, 9A e 9B de *Streptococcus pneumoniae*, serotipos 15B, 15A e 15C de *Streptococcus pneumoniae*, e serotipos 19A e 19F de *Streptococcus pneumoniae*.

15. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de os conjugados do segundo grupo compreenderem conjugados bivalentes e os polissacarídeos capsulares dos conjugados bivalentes terem um peso molecular de 100 KDa a 300KDa.

16. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de a administração de uma única dose gerar uma resposta imune menor à proteína carreadora em comparação com a administração de um conjugado semelhante contendo apenas conjugados monovalentes dos mesmos polissacarídeos.

6A PS (¹H NMR-30KD)

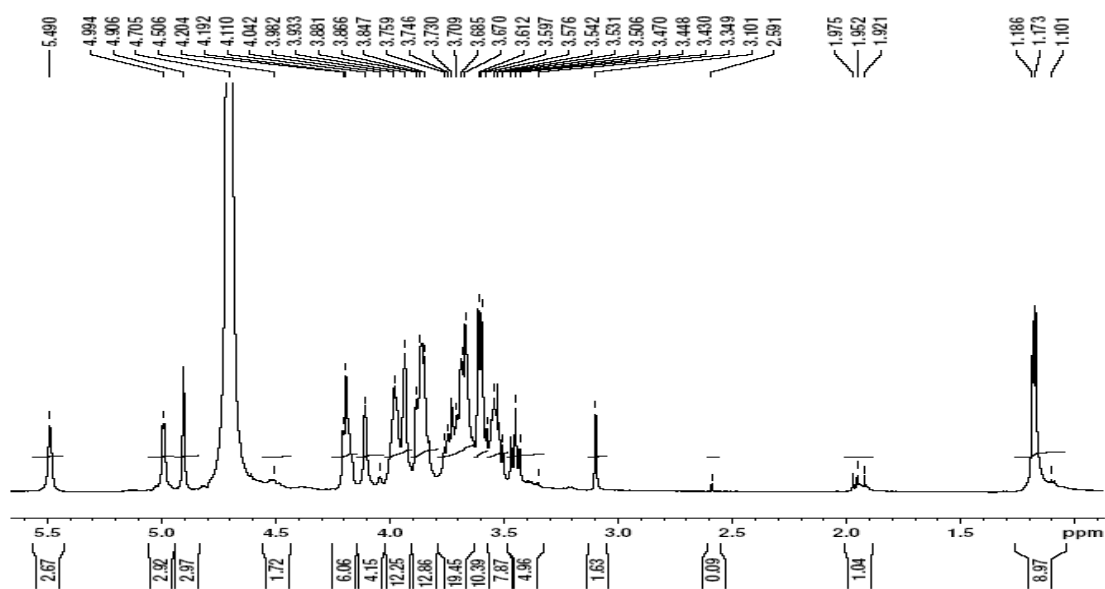


FIGURA 1A

6B PS (¹H NMR-30KD)

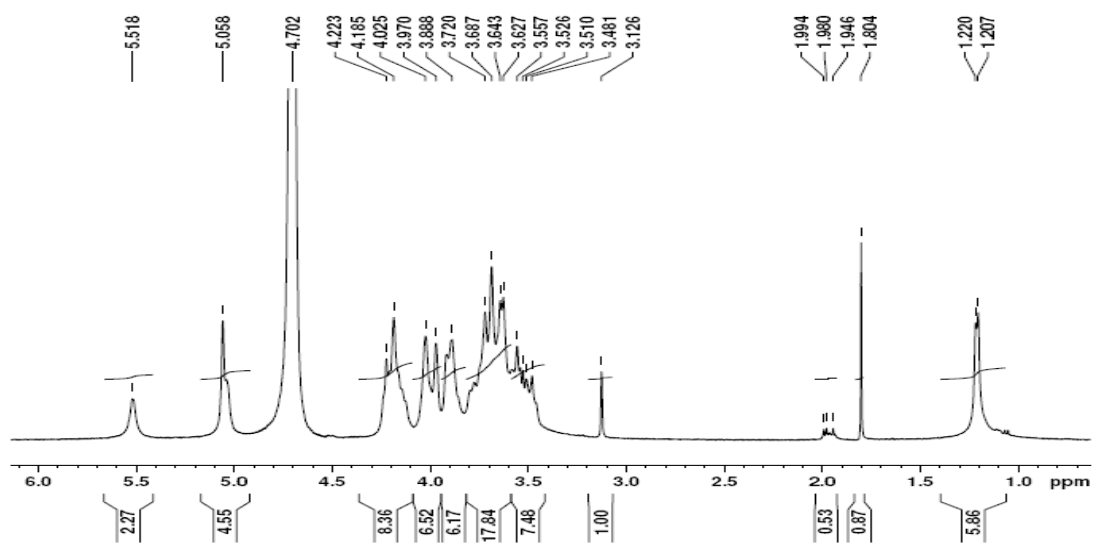


FIGURA 1B

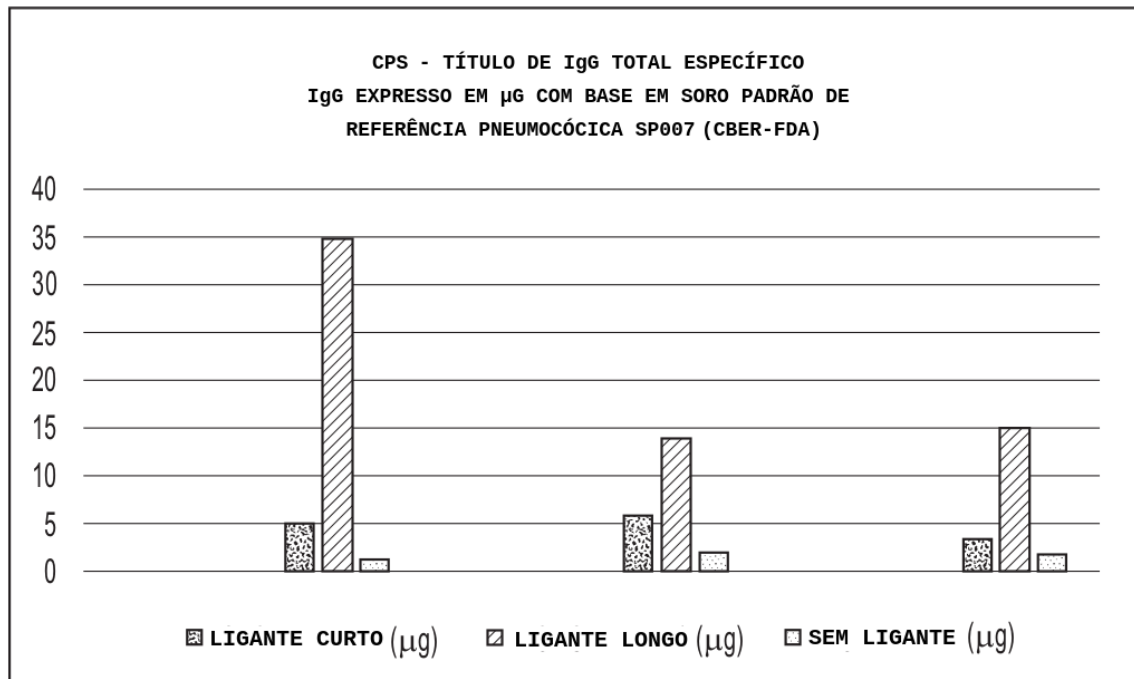


FIGURA 2A

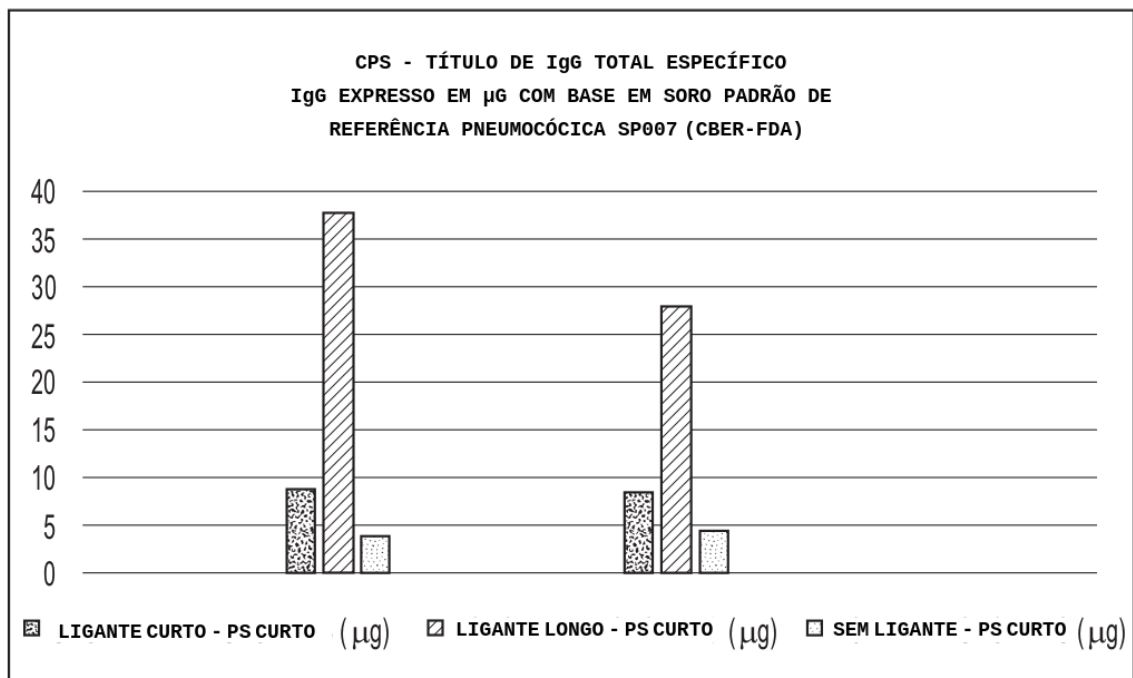
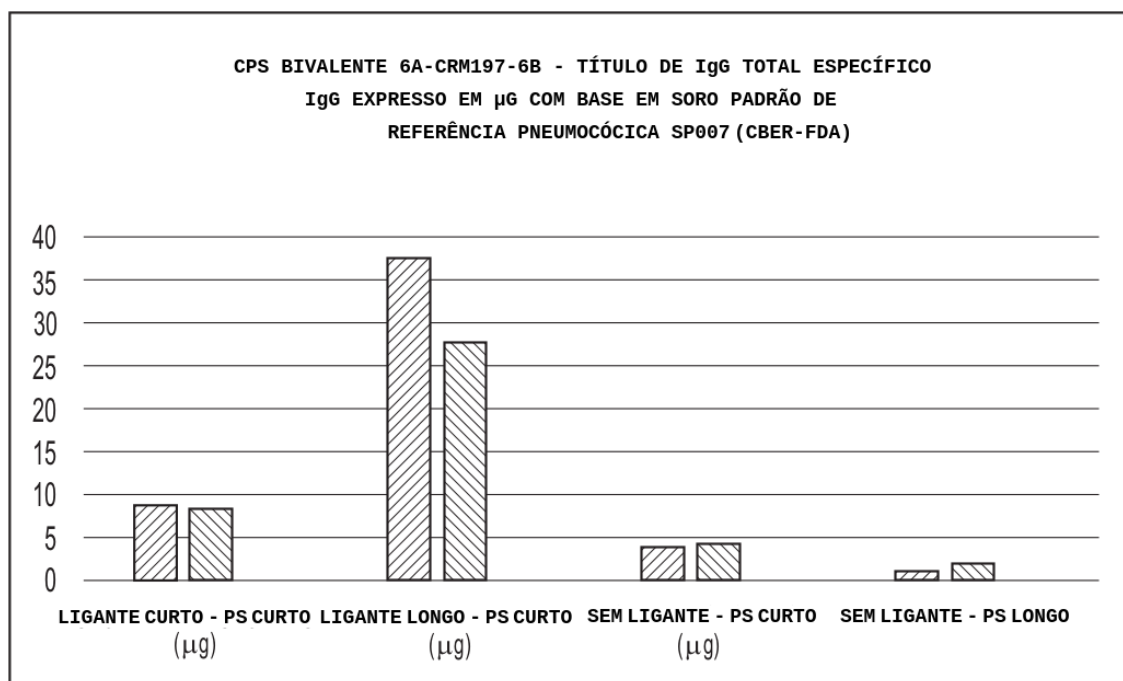


FIGURA 2B

**FIGURA 2C**

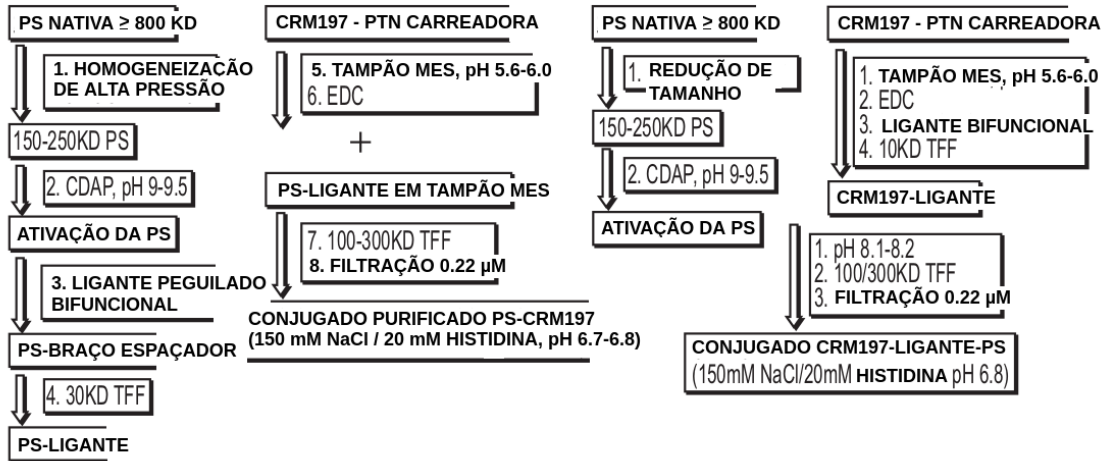


FIGURA 3A

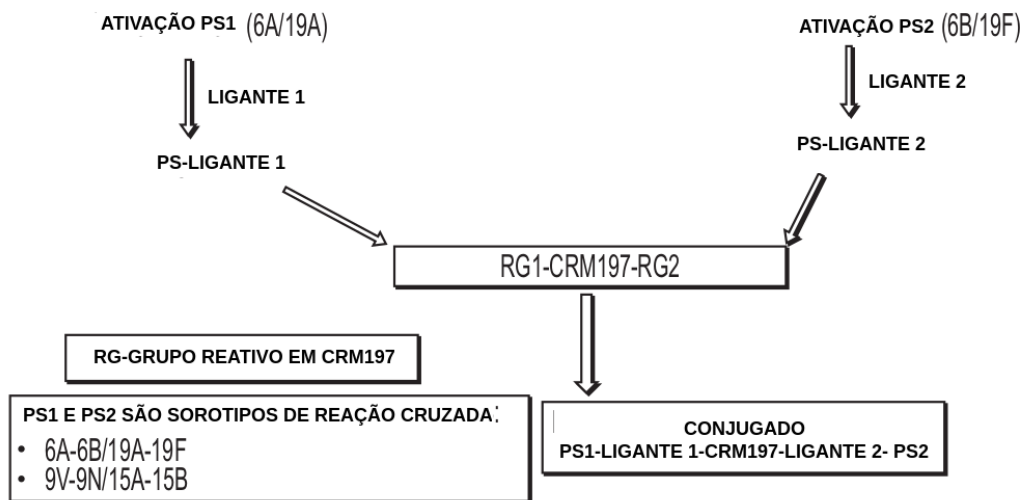


FIGURA 3B

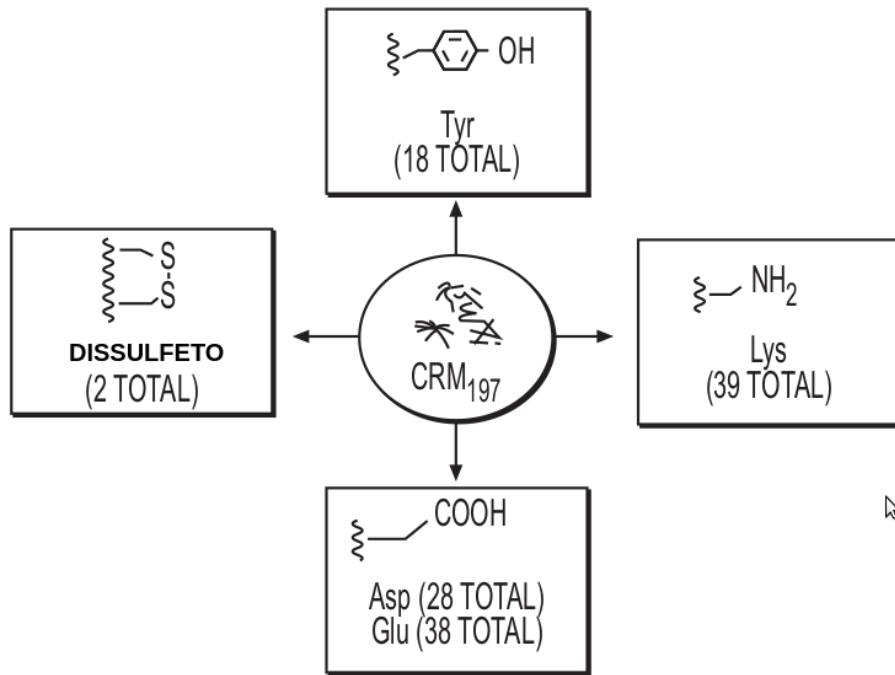


FIGURA 4A

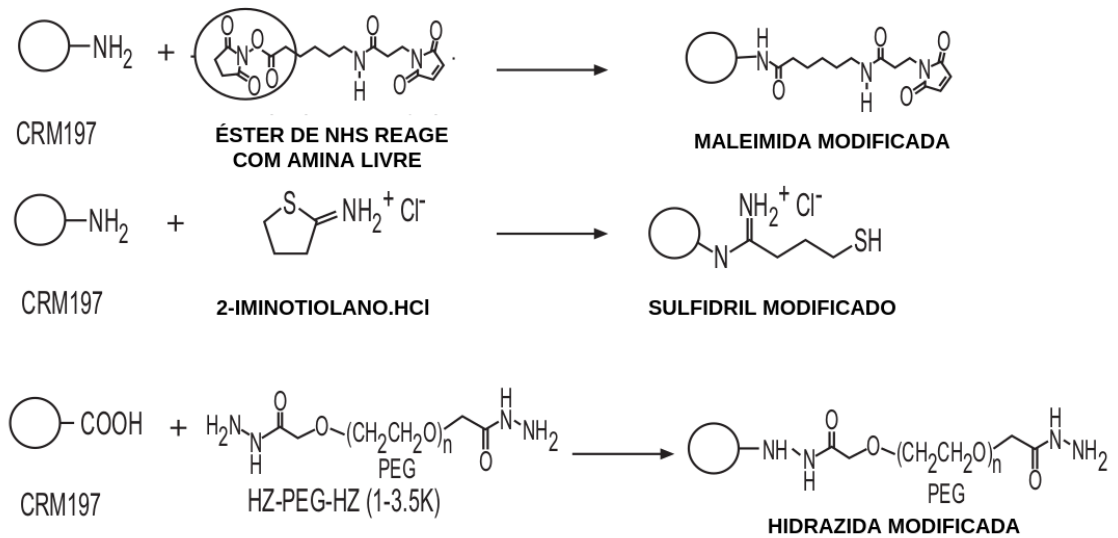


FIGURA 4B

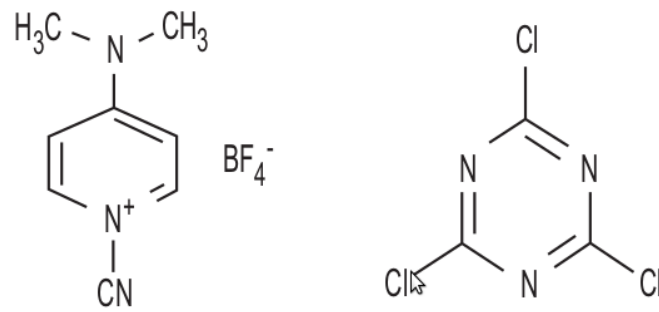


FIGURA 5

TIOLAÇÃO DO CRM197 COM IMINOTIOLENO

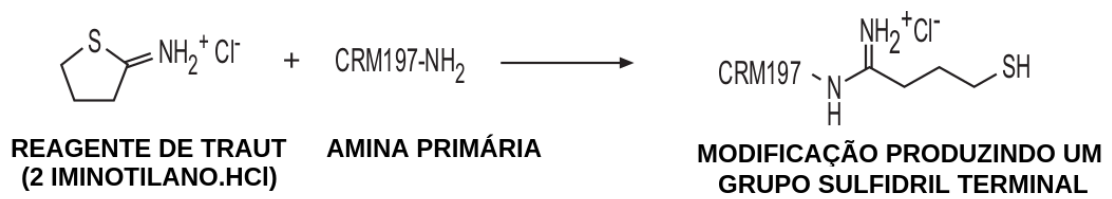


FIGURA 6