



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

(11) PI 0813533-9 B1



(22) Data do Depósito: 17/07/2008

(45) Data de Concessão: 25/05/2021

(54) Título: MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE CONJUGADOS E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 39/09; A61K 47/64; B01D 15/38; B01J 20/04; C07K 1/16; (...).

(52) CPC: A61K 39/092; A61K 47/64; A61K 47/6415; A61K 47/642; A61K 47/646; (...).

(30) Prioridade Unionista: 17/07/2007 GB 0713880.3.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): MASSIMO BIGIO; GIOVANNI AVERANI; FRANCESCO BERTI; CINZIA BELLUCCI; FRANCESCO NORELLI.

(86) Pedido PCT: PCT IB2008002690 de 17/07/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/010877 de 22/01/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/01/2010

(57) Resumo: PURIFICAÇÃO DE CONJUGADO. Este pedido relaciona-se a métodos para a purificação de conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora. Em particular, a invenção fornece um método para purificação de conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora da proteína carreadora livre, como CRM1 97, com o uso de hidroxiapatita. A invenção também relaciona-se a métodos de preparação de vacinas, com o uso desse método.

**“MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE CONJUGADOS E MÉTODO DE PREPARAÇÃO
DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”**

[001] Este pedido reivindica prioridade de Pedido de Patente UK 0713880.3, cujo conteúdo total está aqui incorporado por referência.

Campo técnico

[002] Esta invenção está no campo de vacinas e relaciona-se a um novo método para purificação de conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora.

Técnica de fundamento

[003] Nos últimos 20 anos, as vacinas conjugadas, que compreendem polissacarídeos capsulares bacterianos conjugados a carreadores de proteína, foram desenvolvidas. Exemplos incluem a vacina conjugada de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) [1], bem como vacinas conjugadas contra *Streptococcus pneumoniae* [2] e *Neisseria meningitidis* sorogrupo C (MenC) [3].

[004] As proteínas carreadoras usadas nas vacinas licenciadas incluem toxóide tetânico (TT), toxóide diftérico (DT), o mutante não tóxico CRM197 da toxina diftérica, e o complexo de proteína de membrana externa de *N. meningitidis* grupo B. Idealmente, uma proteína carreadora induz forte efeito *helper* a um epítipo de célula B conjugado (por exemplo, polissacarídeo) sem induzir uma resposta de anticorpo contra si mesma. O uso de epítopos universais, que são imunogênicos no contexto da maioria das moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade, é uma abordagem na direção desse objetivo [4]. Tais epítopos foram identificados em TT e outras proteínas. Alternativamente, proteínas carreadoras de múltiplos

epitopos podem ser usadas, como aquelas descritas na referência 5.

[005] Uma vez que o antígeno sacarídeo foi conjugado à proteína carreadora, a mistura de reação deve ser purificada para remover proteína carreadora livre que não tem antígeno sacarídeo conjugado a ela e sacarídeo não conjugado.

[006] Vários métodos para a purificação de proteína carreadora livre e conjugada são conhecidos na técnica, incluindo cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração etc. [veja também refs. 6 e 7 etc.]. No entanto, esses métodos sofrem de várias desvantagens. Por exemplo, a referência 8 propõe o uso de filtração a gel para purificar conjugados de GBS. No entanto, esse método requer um grande volume de matriz de filtração a gel e é de aplicação difícil em uma escala de manufatura. Um método alternativo que envolve ultrafiltração, por exemplo, que usa diafiltração de fluxo tangencial com uma membrana de 100 kDa, não é eficaz a menos que o antígeno sacarídeo seja de um peso molecular adequadamente alto e é assim não adequado para conjugados de GBS sorotipo III ou outros conjugados em que o antígeno sacarídeo seja < 100 kDa. Além disso, a ultrafiltração pode resultar em um baixo rendimento e estresse do conjugado.

[007] É, portanto, o objetivo da invenção fornecer um método aperfeiçoado de purificação de conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora de impurezas como proteína carreadora não conjugada e sacarídeo não conjugado.

Revelação da invenção

[008] Foi constatado que a conjugação de antígenos sacarídeos a proteínas carreadoras pode alterar a afinidade de ligação das proteínas carreadoras por hidroxiapatita. Portanto, em uma mistura que compreende conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora, proteína carreadora não conjugada e outras proteínas, as proteínas contaminantes/não conjugadas se ligam a hidroxiapatita enquanto os conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora não se ligam.

[009] Portanto, a invenção fornece um método de purificação de conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora de uma mistura, que compreende o contato da referida mistura com hidroxiapatita e coleta dos conjugados livres de antígeno sacarídeo-proteína carreadora. A proteína carreadora não ligada pode ser opcionalmente eluída da hidroxiapatita e reutilizada em uma reação de conjugação, analisada ou descartada.

[0010] A mistura pode compreender conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora e proteína não conjugada. No entanto, a mistura também pode ser contaminada com outras proteínas. O método da invenção permite que sejam removidas quaisquer proteínas contaminantes, assim fornecendo conjugados purificados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora.

[0011] A invenção também fornece um método de preparação de uma composição farmacêutica, que compreende as etapas de i) contato da mistura que compreende conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora e proteína carreadora livre com hidroxiapatita, ii) coleta dos conjugados livres de antígeno sacarídeo-proteína

carreadora, e iii) mistura dos referidos conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora obtidos na etapa ii) com um diluente ou carreador farmacêuticamente aceitável. A invenção também fornece as composições preparadas pelo referido método.

Proteína carreadora

[0012] A proteína carreadora pode ser selecionada daquelas conhecidas na técnica, como toxóide tetânico (TT), toxóide diftérico (DT) ou derivados destes como o mutante não tóxico CRM 197 da toxina diftérica [9-11]. Outras proteínas carreadoras adequadas incluem a proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [12], peptídeos sintéticos [13,14], proteínas *heat shock* [15,16], proteínas de pertussis [17,18], citocinas [19], linfocinas [19], hormônios [19], fatores do crescimento [19], proteínas artificiais que compreendem múltiplos epitopos de célula T CD4+ humana de vários antígenos derivados de patógeno [20] como N19 [21], proteína D de *H.influenzae* [22-24], pneumolisina [25], proteína de superfície pneumocócica PspA [26], proteínas de captação de ferro [27], toxina A ou B de *C.difficile* [28] etc. Entretanto, qualquer proteína carreadora pode ser usada desde que ela se ligue a hidroxiapatita.

[0013] Toxóide diftérico (DT), toxóide tetânico (TT) e CRM197 são os principais carreadores atualmente em uso em vacinas pediátricas, por exemplo, os conjugados HIBERIX™ e MENITORIX™ de GSK usam TT como o carreador, o produto HIBTITER™ usa CRM197, os conjugados pneumocócicos em PREVENAR™ usam CRM197, os produtos MENJUGATE™ e MENINGITEC™ usam CRM197, e NEISVAC-C™ usa TT.

[0014] Alternativamente, a proteína carreadora pode ser uma proteína carreadora de multi-epitopo como aquelas descritas na referência 5. Tais carreadores de multi-epitopo incluem N19.

[0015] Preferivelmente a proteína carreadora usada na invenção é CRM197.

Antígenos sacarídeos

[0016] Preferivelmente, o antígeno sacarídeo conjugado à proteína carreadora na composição purificada pela invenção é um sacarídeo bacteriano e em particular um sacarídeo capsular bacteriano. LPS ou LOS podem ser usados como o antígeno.

[0017] Preferivelmente, o antígeno sacarídeo de acordo com a invenção tem um peso molecular de 5 kDa ou mais, mais preferivelmente 8 kDa ou mais (ou seja, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 kDa ou mais).

[0018] Exemplos de sacarídeos capsulares bacterianos que podem ser incluídos nas composições da invenção incluem sacarídeos capsulares de *Neisseria meningitidis* (sorogrupos A, B, C, W135 e/ou Y), *Streptococcus pneumoniae* (sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, particularmente 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e/ou 23F), *Streptococcus agalactiae* (tipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, e/ou VIII, como os antígenos sacarídeos revelados nas referências 29-32), *Haemophilus influenzae* (cepas típaveis: a, b, c, d, e e/ou f), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (de, por exemplo, sorotipos 5 e 8), *Enterococcus faecalis* ou *E.faecium*

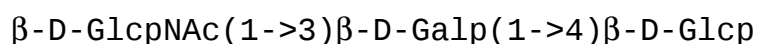
(repetições de trissacarídeo), *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella spp.* etc. Outros sacarídeos que podem ser incluídos nas composições da invenção incluem glicanos (por exemplo, glicanos fúngicos, como aqueles em *Candida albicans*), e sacarídeos capsulares fúngicos, por exemplo, da cápsula de *Cryptococcus neoformans*. Outro sacarídeo que pode ser incluído é o antígeno específico para grupo de *Streptococcus pyogenes* (GAS carboidrato).

Exemplos de LPS e LOS incluem LPS isolado de PA01, sorotipo 05 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[0019] A cápsula de *N.meningitidis* sorogrupo A (MenA) é um homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-ligado, com O-acetilação parcial nas posições C3 e C4. A cápsula de *N.meningitidis* sorogrupo B (MenB) é um homopolímero de ácido siálico ($\alpha 2 \rightarrow 8$)-ligado. O sacarídeo capsular de *N. meningitidis* sorogrupo C (MenC) é um homopolímero de ácido siálico ($\alpha 2 \rightarrow 9$) ligado, com O-acetilação variável nas posições 7 e/ou 8. O sacarídeo de *N.meningitidis* sorogrupo W135 é um polímero que tem unidade de dissacarídeo ácido siálico-galactose [$\rightarrow 4$]-DNeup5Ac(7/90Ac)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Gal- α -($1 \rightarrow$]. Ele tem O-acetilação variável nas posições 7 e 9 do ácido siálico [33]. O sacarídeo de *N.meningitidis* sorogrupo Y é similar ao sacarídeo do sorogrupo W135, exceto pelo fato de a unidade de repetição de dissacarídeo incluir glicose em vez de galactose [$\rightarrow 4$] D-Neup5Ac(7/90Ac)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Glc- α -($1 \rightarrow$]. Ele também tem O-acetilação variável nas posições 7 e 9 do ácido siálico.

[0020] Preferivelmente, os antígenos sacarídeos são

de GBS, sorotipos Ia, Ib e/ou III. Também são preferidos antígenos sacarídeos de outros sorotipos GBS, por exemplo, sorotipos II, IV, V, VI, VII e/ou VIII. Em particular, o antígeno sacarídeo pode ser o sacarídeo capsular de *Streptococcus agalactiae* desses sorotipos, que é covalentemente ligado aos resíduos GlcNAc na estrutura do peptidoglicano da bactéria. Os polissacarídeos capsulares de diferentes sorotipos são quimicamente relacionados, mas são antigenicamente muito diferentes. Todos os polissacarídeos capsulares GBS partilham o seguinte núcleo de trissacarídeo:



[0021] Os vários sorotipos GBS diferem no modo em que seu núcleo é modificado. A diferença entre os sorotipos Ia e III, por exemplo, surge do uso de GlcNAc (Ia) ou Gal (III) no núcleo para ligação de núcleos consecutivos de trissacarídeo (Figura 1). Sorotipos Ia e Ib têm um dissacarídeo [$\alpha\text{-D-NeupNAc}(2\rightarrow3)\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow)$] ligado ao GlcNAc no núcleo, mas a ligação é 1 $\rightarrow$ 4 (Ia) ou 1 $\rightarrow$ 3 (Ib).

[0022] Doença relacionada a GBS surge primariamente dos sorotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, com mais de 90% sendo causados por cinco sorotipos: Ia, Ib, II, III e V. A invenção preferivelmente usa um sacarídeo de um desses cinco sorotipos. Como mostrado na figura 2, os sacarídeos capsulares de cada um desses cinco sorotipos incluem: (a) um resíduo de ácido N-acetil-neuramínico terminal (NeuNAc) (comumente referido como ácido siálico), em que em todos os casos é ligado 2 $\rightarrow$ 3 a um resíduo de galactose; e (b) um resíduo de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) no núcleo do trissacarídeo.

[0023] A proteína carreadora pode ser conjugada a uma mistura de antígenos sacarídeos como descrito na referência 34. A proteína carreadora pode ser conjugada a uma espécie única de sacarídeo ou pode ser conjugada a inúmeras diferentes espécies de sacarídeos. Nesta invenção, preferivelmente as proteínas carreadoras são conjugadas a 2, 3, 4 ou mais diferentes antígenos sacarídeos. Os antígenos podem ser dos mesmos patógenos ou de patógenos antigenicamente distintos.

[0024] Portanto, a proteína carreadora pode ser monovalente, pois cada molécula da proteína carreadora é conjugada a sacarídeos de um único sorogrupo bacterianos, ou pode ser multivalente, pois dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) antígenos sacarídeos antigenicamente distintos são conjugados à mesma molécula da proteína carreadora (por exemplo, veja a referência 34).

[0025] Preferivelmente, as composições da invenção compreendem antígenos sacarídeos de mais de um sorogrupo de *N. meningitidis*, por exemplo, as composições podem compreender sacarídeos conjugados de sorogrupos A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, A+C+W135+Y etc. As composições preferidas compreendem sacarídeos de sorogrupos C e Y. Outras composições preferidas compreendem sacarídeos de sorogrupos C, W135 e Y. As composições particularmente preferidas compreendem sacarídeos de sorogrupos A, C, W135 e Y.

[0026] Em outras combinações, a proteína carreadora pode ser conjugada a um sacarídeo Hib conjugado e um sacarídeo de pelo menos um sorogrupo de *N. ineningitidis*, preferivelmente de mais de um sorogrupo de *N.*

in meningitidis. Por exemplo, a proteína carreadora pode ser conjugada a um sacarídeo de Hib e sacarídeos de um ou mais (ou seja, 1, 2, 3 ou 4) de *N. meningitidis* sorogrupos A, C, W135 e Y. Outras combinações de sacarídeos dos patógenos acima mencionados são também fornecidas.

Preparação de antígenos sacarídeos capsulares

[0027] Métodos para a preparação de antígenos sacarídeos capsulares são bem conhecidos. Por exemplo, ref. 35 descreve a preparação de antígenos sacarídeos de *N. meningitidis*. A preparação de antígenos sacarídeos de *H. influenzae* é descrita no capítulo 14 da ref. 36. A preparação de antígenos sacarídeos e conjugados de *S. pneumoniae* é descrita na técnica. Por exemplo, Prevenar™ é uma vacina conjugada pneumocócica 7-valente. Processos para a preparação de antígenos sacarídeos a partir de *S. agalactiae* são descritos em detalhes nas refs. 37, 38 e 39. Processos preferidos para a preparação de antígenos sacarídeos de *S. agalactiae* são descritos na referência 40. Sacarídeos capsulares podem ser purificados por técnicas conhecidas, como descrito em várias referências nesta especificação.

[0028] Os antígenos sacarídeos podem ser quimicamente modificados. Por exemplo, eles podem ser modificados para substituir um ou mais grupos hidroxil com grupos de bloqueio. Isso é particularmente útil para sorogrupo A meningocócico em que os grupos acetil podem ser substituídos com grupos de bloqueio para prevenir hidrólise [41]. Tais sacarídeos modificados são ainda sacarídeos de sorogrupo A no sentido da presente invenção.

[0029] Em particular, o antígeno sacarídeo de GBS

pode ser modificado. Por exemplo, quando o antígeno sacarídeo é o sacarídeo capsular de sorotipo V de *Streptococcus agalactiae*, então o antígeno sacarídeo pode ser modificado como descrito na ref. 42. Em particular, o sacarídeo capsular de sorotipo V de *Streptococcus agalactiae* pode ser dessialilado (Figura 3). Sacarídeo capsular de GBS sorotipo V dessialilado pode ser preparado por tratamento de sacarídeo capsular de sorotipo V de GBS purificado sob condições levemente ácidas (por exemplo, 0,1M ácido sulfúrico a 80°C por 60 minutos) ou por tratamento com neuraminidase, como descrito na referência 42. Um método preferido para preparar sacarídeo capsular de sorotipo V de GBS dessialilado é por tratamento do sacarídeo purificado com 1M ácido acético a 81°C +/- 3°C por 2h.

[0030] O sacarídeo pode ser quimicamente modificado em relação ao sacarídeo capsular como encontrado na natureza. Por exemplo, o sacarídeo pode ser des-O-acetilado (parcialmente ou totalmente), de-N-acetilado (parcialmente ou totalmente), N-propionilado (parcialmente ou totalmente) etc. A desacetilação pode ocorrer antes, durante ou depois da conjugação, mas ocorre preferivelmente antes da conjugação. Dependendo do sacarídeo particular, a desacetilação pode ou não afetar a imunogenicidade, por exemplo, a vacina NeisVac-C™ usa um sacarídeo des-O-acetilado, enquanto Menjugate™ é acetilada, mas ambas as vacinas são eficazes. O efeito da desacetilação etc. pode ser avaliado por ensaios rotineiros.

[0031] Os sacarídeos capsulares podem ser usados na forma de oligossacarídeos. Esses são convenientemente

formados por fragmentação de polissacarídeo capsular purificado (por exemplo, por hidrólise), que será comumente seguida por purificação dos fragmentos do tamanho desejado. A fragmentação de polissacarídeos é preferivelmente realizada para gerar um grau médio final de polimerização (DP) no oligossacarídeo de menos que 30. DP pode ser medido convenientemente por cromatografia de troca iônica ou por ensaios colorimétricos [43].

[0032] Se a hidrólise é realizada, o hidrolisado terá tamanho determinado geralmente para remover oligossacarídeos de comprimento curto [44]. Isso pode ser realizado de vários modos, como ultrafiltração seguida por cromatografia de troca iônica. Oligossacarídeos com um grau de polimerização de menos que ou igual a cerca de 6 são preferivelmente removidos para sorogrupo A meningococcus, e aqueles com menos que 4 são preferivelmente removidos para sorogrupos W135 e Y.

Conjugados carreador-sacarídeo

[0033] Conjugados purificados pelo método da invenção podem incluir pequenas quantidades de carreador livre (ou seja, não conjugado). Quando uma dada proteína carreadora está presente tanto em forma livre quanto conjugada em uma composição após purificação pelo método da invenção, a forma não conjugada é preferivelmente não mais que 5% da quantidade total da proteína carreadora na composição como um todo (em peso), e mais preferivelmente presente em menos que 2%, mais preferivelmente menos que 1%, preferivelmente menos que 0,5%.

[0034] Os conjugados com uma proporção sacarídeo:proteína (p/p) entre 1:5 (ou seja, excesso de

proteína) e 5:1 (ou seja, excesso de sacarídeo) podem ser purificados pelo método da invenção por exemplo, proporções entre 1:2 e 5:1 e proporções entre 1:1,25 e 1:2,5. Como descrito na referência 45, diferentes conjugados de sorogrupo meningocócico em uma mistura podem ter diferentes proporções de sacarídeo:proteína, por exemplo, um pode ter uma proporção entre 1:2 e 1:5, enquanto outro tem uma proporção entre 5:1 e 1:1,99.

[0035] Qualquer reação de conjugação adequada pode ser usada, com qualquer ligante adequado quando necessário. A ligação do antígeno sacarídeo ao carreador é preferivelmente por meio de um grupo $-NH_2$, por exemplo, na cadeia lateral de um resíduo de lisina em uma proteína carreadora, ou de um resíduo de arginina. Quando um sacarídeo tem um grupo aldeído livre, então esse pode reagir com uma amina no carreador para formar um conjugado por aminação redutora. A ligação pode ser também por meio de um grupo $-SH$, por exemplo, na cadeia lateral de um resíduo de cisteína.

[0036] O sacarídeo será tipicamente ativado ou funcionalizado antes da conjugação. A ativação pode envolver, por exemplo, reagentes de cianilação como CDAP (por exemplo, 1-ciano-4-dimetilamino piridínio tetrafluorborato [46, 47, etc.]). Outras técnicas adequadas usam carbodiimidas, hidrazidas, ésteres ativos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU (veja também a introdução à referência 48).

[0037] Quando o antígeno sacarídeo é um sacarídeo capsular de *Streptococcus agalactiae*, a conjugação envolve tipicamente a aminação redutora do sacarídeo a uma proteína

carreadora, como descrito na referência 37. A aminação redutora envolve um grupo amina na cadeia lateral de um ácido de amino no carreador e um grupo aldeído no sacarídeo. Como sacarídeos capsulares GBS não incluem um grupo aldeído em sua forma natural, então esse é gerado antes da conjugação por oxidação de periodato de uma porção dos resíduos de ácido siálico do sacarídeo, como mostrado na figura 4 [37,49]. A conjugação de um sacarídeo capsular de *Streptococcus agalactiae* a uma proteína carreadora também pode ser realizada com o uso dos métodos descritos na referência 50.

[0038] Como descrito na referência 51, uma mistura de conjugados pode incluir um conjugado com ligação direta de sacarídeo/proteína e outro conjugado com ligação por meio de um ligante. Esse arranjo aplica-se particularmente quando do uso de conjugados de sacarídeo de diferentes sorogrupos meningocócicos, por exemplo, sacarídeos MenA e MenC podem ser conjugados por meio de um ligante, enquanto os sacarídeos MenW135 e MenY podem ser conjugados diretamente a uma proteína carreadora. Tais conjugados podem ser purificados pelo método da invenção.

[0039] A concentração de carreador (conjugado e não conjugado) de cada conjugado pode ser não mais que 100 µg/ml, por exemplo, <30 µg/ml de proteína carreadora de cada conjugado. Algumas composições incluem uma concentração total de carreador de menos que 500 µg/ml, por exemplo, <400 µg/ml, <300 µg/ml, <200 µg/ml, <100 µg/ml, <50 µg/ml, etc.

Ligantes

[0040] As ligações por meio de um grupo ligante

podem ser feitas com o uso de qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos descritos nas referências 52 e 53. Um tipo de ligação envolve aaminação redutora do sacarídeo, ligação do grupo amino resultante com uma extremidade de um grupo ligante de ácido adípico, e então ligação da proteína carreadora à outra extremidade do grupo ligante de ácido adípico [54, 55]. Outros ligantes incluem B-propionamido [56], nitrofenil-etilamina [57], haloacil haletos [58], ligações glicosídicas [59], ácido 6-aminocaproico [60], ADH [61], porções C₄ a C₁₂ [62] etc. Como uma alternativa ao uso de um ligante, pode ser usada ligação direta. Ligações diretas a uma proteína podem compreender oxidação do polissacarídeo seguida por aaminação redutora com uma proteína, como descrito, por exemplo, nas referências 63 e 64.

[0041] Um processo que envolve a introdução de grupos amino no sacarídeo (por exemplo, por substituição de grupos =O terminais com -NH₂) seguida por derivatização com um diéster adípico (por exemplo, N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico) e reação com proteína carreadora é preferida.

[0042] Um ligante bifuncional pode ser usado para fornecer um primeiro grupo para ligação a um grupo amina no sacarídeo e um segundo grupo para ligação ao carreador (tipicamente para ligação a uma amina no carreador). O primeiro grupo no ligante bifuncional é assim capaz de reagir com um grupo amina (-NH₂) no sacarídeo. Essa reação envolverá tipicamente uma substituição eletrofílica do hidrogênio da amina. O Segundo grupo no ligante bifuncional é capaz de reagir com um grupo amina no carreador. Essa

reação envolverá tipicamente uma substituição eletrofílica da amina.

[0043] Quando as reações com o sacarídeo e o carreador envolvem aminas, então é preferível usar um ligante bifuncional de fórmula X-L-X, em que: os dois grupos X são o mesmo que o outro e podem reagir com as aminas; e em que L é uma porção de ligação no ligante. Um grupo X preferido é N-oxissuccinimida. L preferivelmente tem a fórmula L'-L²-L', em que L' é carbonil. Grupos L² preferidos são alquil de cadeia linear com 1 a 10 átomos de carbono (por exemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀), por exemplo, -(CH₂)₄-.

[0044] Outros grupos X são aqueles que formam ésteres quando combinados com HO-L-OH, como norborano, ácido p-nitrobenzoico e sulfo-N-hidroxisuccinimida.

[0045] Ligantes bifuncionais adicionais para uso com a invenção incluem acrilóil haletos (por exemplo, cloreto) e haloacilhaletos.

[0046] O ligante será geralmente adicionado em excesso molar ao sacarídeo modificado.

[0047] Depois da conjugação, sacarídeos livres e conjugados podem ser separados. Há vários métodos adequados, que incluem cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração etc. [veja também as refs. 65 & 66 etc.].

[0048] Quando a composição da invenção inclui um sacarídeo despolimerizado, é preferível que a despolimerização preceda a conjugação.

Hidroxiapatita

[0049] A hidroxiapatita ((Ca₅(PO₄)₃OH)₂) usada na

invenção pode estar em uma de inúmeras formas conhecidas na técnica. A hidroxiapatita pode estar na forma de cristais, um gel ou uma resina. A forma cristalina normal pode ser alternativamente sinterizada em altas temperaturas para modificá-la a uma forma de cerâmica (Bio-Rad).

[0050] Preferivelmente, a hidroxiapatita está na forma de um gel. Preferivelmente, o gel é embalado em uma coluna, como comumente usado em purificação por cromatografia.

[0051] Se a hidroxiapatita está em forma particulada, preferivelmente as partículas têm um diâmetro de 20 μm ou mais, preferivelmente 40 μm ou mais, preferivelmente 80 μm ou mais.

[0052] Preferivelmente, a hidroxiapatita tem uma capacidade de ligação dinâmica de > 10 mg de lisozima por grama (por exemplo, 12,5, 15, 17,5, 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 35, 40, 45, 50 ou mais).

pH

[0053] Preferivelmente, o método é realizado em um pH entre 6 e 8, mais preferivelmente 6,5 a 7,5, mais preferivelmente 7,2. O pH 7,2 é preferido uma vez que isso ajuda a assegurar a estabilidade do sacarídeo. O pH pode ser ajustado com o uso de ácidos/bases conhecidos na técnica.

Concentração de fosfato

[0054] Diferentes concentrações de fosfato usadas no método podem ter um efeito sobre o rendimento do conjugado da reação. Preferivelmente, a concentração de fosfato do material de iniciação e lavagem de equilíbrio/pós-carga é 50 mM ou menos (ou seja, 45, 40, 35,

30, 25, 20, 15, 10, 5 ou menos). Tipicamente, uma concentração de 35 mM é usada. Concentrações maiores podem resultar na inibição da ligação pela hidroxiapatita.

[0055] Tipicamente um tampão de fosfato de sódio é usado.

Antígenos adicionais

[0056] Como acima observado, conjugados purificados pela invenção podem ser formulados como a composição farmacêutica pela adição de um diluente ou carreador farmacêuticamente aceitável. Tais composições também podem compreender um ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) antígenos adicionais, como:

A. Antígenos Bacterianos

[0057] *Neisseria meningitidis*: antígenos meningocócicos podem incluir proteínas (como aquelas identificadas nas referências 67-73), sacarídeos (incluindo um polissacarídeo, oligossacarídeo ou lipopolissacarídeo), ou vesículas de membrana externa [74-77] purificadas ou derivadas de um *N. meningitidis* sorogrupo como A, C, W135, Y, e/ou B. Antígenos de proteína meningocócica podem ser selecionados de adesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de aquisição de ferro, e proteínas associadas a membrana (preferivelmente, proteínas de membrana externa integrais). Veja também refs. 78-86.

[0058] *Streptococcus pneumoniae*: antígenos de *S. pneumoniae* podem incluir um sacarídeo (que inclui um polissacarídeo ou um oligosacarídeo) e/ou proteína de *S. pneumoniae*. Os antígenos da proteína podem ser selecionados, por exemplo, de uma proteína identificada em qualquer uma das refs. 87-92. As proteínas de *S. pneumoniae*

podem ser selecionadas da família de “tríade de Poli Histidina” (PhtX), da família de Proteína de ligação de colina (CbpX), truncações de CbpX, família LytX, truncações de LytX, proteínas quimericas de truncações de CbpX-truncações de LytX, pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 ou Sp133. Veja também refs. 93-99.

[0059] *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* Grupo A): antígenos de *Streptococcus* Grupo A podem incluir uma proteína identificada na referência 100 ou 101 (incluindo GAS40), fusões de fragmentos de proteínas GAS M (incluindo aquelas descritas na refs. 102-104), proteína de ligação de fibronectina (Sfbl), proteína associada a heme estreptocócico (Shp) e estreptolisina S (SagA). Veja também refs. 100, 105 e 106.

[0060] *Moraxella catarrhalis*: antígenos de *Moraxella* incluem antígenos identificados nas refs. 107 & 108, antígenos de proteína de membrana externa (HMW-OMP), antígeno C, e/ou LPS. Veja também ref. 109.

[0061] *Bordetella pertussis*: antígenos de *Pertussis* incluem holotoxina de petussis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com antígeno de pertactina e/ou aglutinogênios 2 e 3. Veja também refs. 110 & 111.

[0062] *Staphylococcus aureus*: antígenos de *S. aureus* incluem polissacarídeos capsulares de *S. aureus* tipo 5 e 8 opcionalmente conjugados a exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* não tóxica recombinante, como StaphVAX™, ou antígenos derivados de proteínas de superfície, invasinas (leucocidina, quinases, hialuronidase), fatores de superfície que inibem a deglutição fagocítica (cápsula,

Proteína A), carotenóides, produção de catalase, Proteína A, coagulase, fator de coagulação, e/ou toxinas de dado à membrana (opcionalmente desintoxicadas) que lisam membranas de células eucariótica (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina). Veja também ref. 112.

[0063] *Clostridium tetani* (Tétano): antígenos de tétano incluem toxóide tetânico (TT), preferivelmente usado como uma proteína carreadora junto/conjugado com as composições da presente invenção.

[0064] *Corynebacterium difteriae* (Difteria): antígenos de difteria incluem toxina diftérica ou mutantes desintoxicados desta, como CRM197. Adicionalmente, antígenos capazes de modular, inibir ou associar com ribosilação de ADP são contemplados para combinação /coadministração/conjugação com as composições da presente invenção. Esses antígenos diftéricos podem ser usados como proteínas carreadoras.

[0065] *Haemophilus influenzae*: antígenos de *H. influenzae* incluem um antígeno sacarídeo de tipo B, ou proteína D [24].

[0066] *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de Grupo B): antígenos de *Streptococcus* de Grupo B incluem antígenos de proteína identificados nas refs. 100 e 113-116. Por exemplo, os antígenos incluem as proteínas GBS80, GBS 104, GBS276 e GBS322.

[0067] *Neisseria gonorrhoeae*: antígenos gonocócicos incluem preparações de proteína por (ou porina), como PorB [117], uma proteína de ligação de transferrina, como TbpA e TbpB [118], uma proteína de opacidade (como Opa), uma proteína de redução modificável (Rmp), e vesícula de

membrana externa (OMV) [119]. Veja também refs. 67-69 & 120.

[0068] *Chlamydia trachomatis*: antígenos de *C. trachomatis* incluem antígenos derivados de sorotipos A, B, Ba e C (agentes de tracoma, uma causa de cegueira), sorotipos L1, L2 & L3 (associados com *Lymphogranuloma venereum*), e sorotipos, D-K. Os antígenos de *C. trachomatis* também podem incluir um antígeno identificado nas refs. 116 & 121-123, incluindo PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), DnaK (CT396), CT398, OmpH-like (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823) e MurG (CT761). Veja também ref. 124.

[0069] *Salmonella typhi* (febre tifóide): Antígenos incluem polissacarídeos capsulares preferivelmente conjugados (Vi, por exemplo, vax-TyVi).

B. Antígenos virais

[0070] *Orthomyxovirus*: antígenos virais podem ser derivados de um *Orthomyxovirus*, como Influenza A, B e C. Antígenos de *Orthomyxovirus* podem ser selecionados de uma ou mais das proteínas virais, incluindo hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), um ou mais dos componentes de transcriptase (PB1, PB2 e PA). Os antígenos preferidos incluem HA e NA.

[0071] Os antígenos de Influenza podem ser derivados de cepas de gripe interpandêmicas (anual). Alternativamente, os antígenos de influenza podem ser derivados de cepas com o potencial de causar um surto pandêmico (ou seja, cepas de influenza com nova hemaglutinina comparada à hemaglutinina em cepas atualmente

circulantes, ou cepas de influenza que são patogênicas em aves e têm o potencial de serem transmitidas horizontalmente na população humana, ou cepas de influenza que são patogênicas para humanos).

[0072] *Vírus Paramyxoviridae*: antígenos virais podem ser derivados de vírus *Paramyxoviridae*, como Pneumovírus (RSV), Paramixovírus (PIV) e Morbilivírus (sarampo). [125-127].

[0073] *Pneumovírus*: antígenos virais podem ser derivados de um Pneumovírus, como vírus sincicial respiratório (RSV), vírus sincicial respiratório bovino, vírus da Pneumonia de camundongos e vírus da rinotraqueíte em perus. Preferivelmente, o Pneumovírus é RSV. Os antígenos de Pneumovírus podem ser selecionados de uma ou mais das seguintes proteínas, incluindo proteínas de superfície, fusão (F), Glicoproteína (G) e proteína pequena hidrofóbica (SH), proteínas M e M2 de matriz, proteínas de nucleocapsídeo N, proteínas P e L e não estruturais NS 1 e NS2. Os antígenos preferidos de Pneumovírus incluem F, G e M. Veja, por exemplo, a ref. 128. Os antígenos de Pneumovírus também podem ser formulados ou derivados de vírus quiméricos. Por exemplo, vírus RSV/PIV quiméricos podem compreender componentes de RSV e PIV.

[0074] *Paramyxovírus*: Antígenos virais podem ser derivados de um Paramixovírus, como vírus Parainfluenza tipos 1 – 4 (PIV), caxumba, vírus Sendai, vírus 5 de símio, vírus parainfluenza bovino e vírus da doença de Newcastle. Preferivelmente, o *Paramyxovírus* é PIV ou caxumba. Os antígenos de paramixovírus podem ser selecionados de uma ou mais das seguintes proteínas: Hemaglutinina Neuraminidase

(HN), Proteínas de fusão F1 e F2, Nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína grande (L), e proteína de matriz (M). Proteínas de paramixovírus preferidas incluem HN, F1 e F2. Os antígenos de paramixovírus também podem ser formulados em ou derivados de vírus quiméricos. Por exemplo, vírus RSV/PIV quiméricos podem compreender componentes de RSV e PIV. As vacinas de caxumba comercialmente disponíveis incluem vírus da caxumba atenuado vivo, em forma monovalente ou em combinação com vacinas de sarampo e rubéola (MMR).

[0075] *Morbillivirus*: Antígenos virais podem ser derivados de um *Morbillivirus*, como sarampo. Os antígenos de *Morbillivirus* podem ser selecionados de uma ou mais das seguintes proteínas: hemaglutinina (H), Glicoproteína (G), fator de fusão (F), proteína grande (L), Nucleoproteína (NP), Polimerase fosfoproteína (P) e Matriz (M). As vacinas de sarampo comercialmente disponíveis incluem vírus de sarampo atenuado vivo, tipicamente em combinação com caxumba e rubéola (MMR).

[0076] *Enterovirus*: Antígenos virais podem ser derivados de um Enterovírus, como Poliovírus tipos 1, 2 ou 3, vírus Coxsackie A tipos 1 a 22 e 24, vírus Coxsackie B tipos 1 a 6, Echovírus (vírus ECHO) tipos 1 a 9, 11 a 27 e 29 a 34 e Enterovírus 68 a 71. Preferivelmente, o Enterovírus é poliovírus. Os antígenos de enterovírus são preferivelmente selecionados de uma ou mais das seguintes proteínas de Capsídeo VP1, VP2, VP3 e VP4. Vacinas de polio comercialmente disponíveis incluem Vacina de Polio Inativada (IPV) e vacina de poliovírus oral (OPV).

[0077] *Heparnavírus*: Antígenos virais podem ser

derivados de um Heparnavírus, como vírus da Hepatite A (HAV). Vacinas de HAV comercialmente disponíveis incluem Vacinas de HAV inativadas. [129,130].

[0078] *Togavírus*: Antígenos virais podem ser derivados de um Togavírus, como um Rubivírus, um Alfavírus, ou um Arterivírus. Antígenos derivados de Rubivírus, como vírus da rubéola, são preferidos. Os antígenos de Togavírus podem ser selecionados de E1, E2, E3, C, NSP-1, NSP0-2, NSP-3 ou NSP-4. Os antígenos de Togavírus são preferivelmente selecionados de E1, E2 ou E3. Vacinas de rubéola comercialmente disponíveis incluem um vírus vivo adaptado ao frio, tipicamente em combinação com vacinas de caxumba e sarampo (MMR).

[0079] *Hepadnavírus*: Antígenos virais podem ser derivados de um Hepadnavírus, como vírus da Hepatite B. Os antígenos de Hepadnavírus podem ser selecionados de antígenos de superfície (L, M e S), antígenos de núcleo (HBc, HBe). Vacinas de HBV comercialmente disponíveis incluem vacinas de subunidade que compreendem a proteína S de antígeno de superfície [130,131].

[0080] *Papovavírus*: Antígenos podem ser derivados de Papovavírus, como Papilomavírus e Poliomavírus. Papilomavírus incluem sorotipos de HPV 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 e 65. Preferivelmente, antígenos de HPV são derivados de sorotipos 6, 11, 16 ou 18. Os antígenos de HPV podem ser selecionados de proteínas de capsídeo (L1) e (L2), ou E1 – E7, ou fusões destes. Os antígenos de HPV são preferivelmente formulados em partículas semelhantes a vírus (VLPs). Poliomavírus incluem vírus BK e vírus JK. Os

antígenos de Poliomavírus podem ser selecionados de VP1, VP2 ou VP3.

C. Formulações de Antígeno

[0081] Em outros aspectos da invenção, são fornecidos métodos de produção de micropartículas que têm antígenos adsorvidos. Os métodos compreendem: (a) o fornecimento de uma emulsão por dispersão de uma mistura que compreende (i) água, (ii) um detergente, (iii) um solvente orgânico, e (iv) um polímero biodegradável selecionado do grupo que consiste em um ácido poli(α -hidroxi), um ácido polihidroxi butírico, uma policaprolactona, um poliortoéster, um polianidrido e um policianoacrilato. O polímero é tipicamente presente na mistura em uma concentração de cerca de 1% a cerca de 30% em relação ao solvente orgânico, enquanto o detergente é tipicamente presente na mistura em uma proporção peso a peso de detergente-para-polímero de cerca de 0,00001:1 a cerca de 0,1:1 (mais tipicamente cerca de 0,0001:1 a cerca de 0,1:1, cerca de 0,001:1 a cerca de 0,1:1, ou cerca de 0,005:1 a cerca de 0,1:1); (b) remoção do solvente orgânico da emulsão; e (c) adsorção de um antígeno na superfície das micropartículas. Em certas modalidades, o polímero biodegradável está presente em uma concentração de cerca de 3% a cerca de 10% em relação ao solvente orgânico.

[0082] Micropartículas para uso nesta especificação serão formadas a partir de materiais que são esterilizáveis, biodegradáveis e não tóxicos. Tais materiais incluem, sem limitação, ácido poli(α -hidroxi), ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, poliortoéster, polianidrido, PACA e policianoacerilato. Preferivelmente,

as micropartículas para uso com a presente invenção são derivadas de um ácido poli(α -hidroxi), em particular de uma poli(lactida) ("PLA") ou um copolímero de D,L-lactida e glicolida ou ácido glicólico, como poli(D,L-lactida-co-glicolida) ("PLG" ou "PLGA", ou um copolímero de D,L-lactida e caprolactona. As Micropartículas podem ser derivadas de qualquer um dos vários materiais de iniciação poliméricos que têm vários pesos moleculares e, no caso dos copolímeros como PLG, várias proporções de lactida:glicolida, cuja seleção será uma matéria de escolha, dependendo, em parte, da macromolécula coadministrada. Esses parâmetros são discutidos mais amplamente abaixo.

Métodos e usos médicos

[0083] Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas diretamente a um indivíduo. Os indivíduos a serem tratados podem ser animais; em particular, seres humanos podem ser tratados. As composições podem ser formuladas como vacinas que são particularmente úteis para vacinação de crianças e adolescentes. Elas podem ser liberadas por vias sistêmica e/ou mucosa.

[0084] Tipicamente, as composições são preparadas como injetáveis, como soluções ou suspensões líquidas; formas sólidas adequadas para solução, ou suspensão, em veículos líquidos antes da injeção também podem ser preparadas. A liberação direta das composições será geralmente parenteral (por exemplo, por injeção, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular ou liberada ao espaço intersticial de um tecido). As

composições também podem ser administradas em uma lesão. Outros modos de administração incluem administração oral e pulmonar, supositórios, e aplicações transdérmicas ou transcutâneas (por exemplo, veja a ref. 132), agulhas, e hiposprays. A dosagem de tratamento pode ser um esquema de dose única ou um esquema de dose múltipla (por exemplo, incluindo doses de reforço).

[0085] As vacinas da invenção são preferivelmente estéreis. Elas são preferivelmente livres de pirógeno. Elas são preferivelmente tamponadas, por exemplo, entre pH 6 e pH 8, geralmente por volta do pH 7. Quando uma vacina compreende um sal de hidróxido de alumínio, é preferível usar um tampão de histidina [133].

[0086] As vacinas da invenção podem compreender detergentes (por exemplo, um Tween, como Tween 80) em baixos níveis (por exemplo, < 0,01%). As vacinas da invenção podem compreender um álcool de açúcar (por exemplo, manitol) ou trehalose, por exemplo, por volta de 15 mg/ml, particularmente se elas forem liofilizadas.

[0087] Doses ótimas de antígenos individuais podem ser avaliadas empiricamente. Em geral, no entanto, antígenos conjugados purificados pelo método da invenção serão administrados em uma dose entre 0,1 e 100 µg de cada sacarídeo por dose, com um volume de dosagem típico de 0,5 ml. A dose é tipicamente entre 5 e 20 µg por sacarídeo por dose. Esses valores são medidos como sacarídeo no conjugado.

[0088] As vacinas de acordo com a invenção podem ser profiláticas (ou seja, para prevenir infecção) ou terapêuticas (ou seja, para tratar doença após infecção),

mas será tipicamente profilática.

[0089] A invenção fornece um conjugado purificado pelo método da invenção para uso em medicina.

[0090] A invenção também fornece um método de despertar uma resposta imune em um paciente, que compreende a administração a um paciente de um conjugado de acordo com a invenção. A resposta imune é preferivelmente protetora contra doença meningocócica, doença pneumocócica ou *H influenzae* tipo B e pode compreender uma resposta imune humoral e/ou uma resposta imune celular. O paciente é preferivelmente uma criança. O método pode despertar uma resposta de reforço em um paciente que já foi vacinado contra *meningococcus*, *pneumococcus* ou *H. influenzae* tipo B. Em outras modalidades, a resposta imune é protetora contra *Streptococcus agalactiae* e pode compreender uma resposta imune humoral e/ou uma resposta imune celular. O paciente é preferivelmente uma criança, neonato ou mulher grávida. O método pode despertar uma resposta de reforço em um paciente que já foi vacinado contra *Streptococcus agalactiae*.

[0091] A invenção também fornece o uso de um conjugado da invenção na manufatura de um medicamento para despertar uma resposta imune em um paciente, em que o referido paciente foi pré-tratado com um diferente antígeno sacarídeo daquele compreendido na composição conjugada a um carreador.

[0092] A invenção também fornece o uso de um conjugado na manufatura de um medicamento para despertar uma resposta imune em um paciente, em que o referido paciente foi pré-tratado com o mesmo antígeno sacarídeo que

aquele compreendido na composição conjugada a um diferente carreador.

[0093] O medicamento é preferivelmente uma composição imunogênica (por exemplo, uma vacina). O medicamento é preferivelmente para a prevenção e/ou tratamento de uma doença causada por uma *Neisseria* (por exemplo, meningitis, septicaemia, gonorrhoea etc.), por *H. influenzae* (por exemplo, otite média, bronquite, pneumonia, celulite, pericardite, meningite etc.) ou por *pneumococcus* (por exemplo, meningite, sepsis, pneumonia etc). A prevenção e/ou tratamento de meningite bacteriana é, portanto, preferida. Em outras modalidades, o medicamento é para a prevenção e/ou tratamento de uma doença causada por *Streptococcus agalactiae*. A prevenção e/ou o tratamento de tais doenças é também preferido.

[0094] As vacinas podem ser testadas em modelos padrão de animal (por exemplo, veja a ref. 134).

Adjuvantes

[0095] Os conjugados da invenção podem ser administrados junto com outros agentes imuno-reguladores. Em particular, as composições incluirão comumente um adjuvante. Os adjuvantes que podem ser usados nas composições da invenção incluem, mas não se limitam a: **A.**

Composições que contêm mineral

[0096] Composições que contêm mineral para uso como adjuvantes na invenção incluem sais minerais, como sais de alumínio e sais de cálcio. Tais composições minerais podem incluir sais minerais como hidróxidos (por exemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por exemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos etc. [por exemplo, veja os

capítulos 8 & 9 da ref. 135], ou misturas de diferentes compostos minerais (por exemplo, uma mistura de um adjuvante de fosfato e um hidróxido, opcionalmente com um excesso do fosfato), com os compostos assumindo qualquer forma adequada (por exemplo, gel, cristalinos, amorfos etc.), e com a adsorção a esses sais sendo preferida. As composições que contêm minerais também podem ser formuladas como uma partícula de sal metálico [136].

[0097] Sais de alumínio podem ser incluídos nas composições da invenção de modo que a dose de Al^{3+} é entre 0,2 e 1,0 mg por dose.

[0098] Um adjuvante de fosfato de alumínio típico é hidroxifosfato de alumínio amorfo com proporção molar de PO_4/Al entre 0,84 e 0,92, incluído a 0,6 mg Ala/ml . A adsorção com uma baixa dose de fosfato de alumínio pode ser usada, por exemplo, entre 50 e 100 μg Al^{3+} por conjugado por dose. Quando um fosfato de alumínio é usado e é desejável não adsorver um antígeno ao adjuvante, isso é favorecido por inclusão de íons fosfato livres na solução (por exemplo, pelo uso de um tampão de fosfato).

B. Emulsões oleosas

[0099] Composições de emulsão oleosas adequadas para uso como adjuvantes com conjugados da invenção incluem emulsões de esqualeno-água, como MF59 (5% esqualeno, 0,5% Tween 80, e 0,5% Span 85, formulados em partículas submícron com o uso de um microfluidificador) [Capítulo 10 da ref. 135; veja também refs. 137-139]. MF59 é usado como o adjuvante na vacina de subunidade trivalente de vírus influenza FLUAD™. A emulsão de MF59 inclui vantajosamente íons citrato, por exemplo, 10 mM de tampão de citrato de

sódio.

[00100] Adjuvantes particularmente preferidos para uso nas composições são emulsões submícron óleo-em-água. Emulsões submícron óleo-em-água preferidas para uso nesta especificação são emulsões de esqualeno/água opcionalmente contendo quantidades variáveis de MTP-PE, como uma emulsão submícron óleo-em-água que contém 4-5% w/v esqualeno, 0,25-1,0% w/v Tween 80 (monooleato de polioxietilenossorbitano), e/ou 0,25-1,0% Span 85 (trioleato de sorbitano), e, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-ísogluataminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi fosforiloxi) etilamina (MTP-PE). Emulsões submícron óleo-em-água, métodos de confeccionar as mesmas e agentes imuno-estimulantes, como muramil peptídeos, para uso nas composições, são descritos em detalhes nas referências 137 & 140-141.

[00101] Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol e Tween 80 podem ser usados. A emulsão pode incluir solução salina tamponada com fosfato. Ela também pode incluir Span 85 (por exemplo, a 1%) e/ou lecitina. Essas emulsões podem ter de 2 a 10% de esqualeno, de 2 a 10% de tocoferol e de 0,3 a 3% de Tween 80, e a proporção de peso de esqualeno:tocoferol é preferivelmente ≤ 1 , na medida em que essa proporção fornece uma emulsão mais estável. Uma emulsão desse tipo pode ser feita dissolvendo Tween 80 em PBS, para gerar uma solução 2%, e depois misturando 90 ml dessa solução com uma mistura de 5 g de DL- α -tocoferol e 5 ml de esqualeno, e microfluidizando-se a mistura. A emulsão resultante pode ter gotículas de óleo submícron, por exemplo, com um diâmetro médio entre 100 e 250 nm,

preferivelmente cerca de 180 nm.

[00102] Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol e um detergente Triton (por exemplo, Triton X-100) pode ser usada.

[00103] Uma emulsão de esqualano, polissorbato 80 e poloxâmero 401 ("Pluronic™ L121") pode ser usada. A emulsão pode ser formulada em solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4. Essa emulsão é um veículo de liberação útil para muramil dipeptídeos, e foi usada com treonil-MDP no adjuvante "SAF-1" [142] (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de esqualano, 2,5% de Plurônico L121 e 0,2% de polissorbato 80). Ela também pode ser usada sem o Thr-MDP, como no adjuvante "AF" [143] (5% de esqualano, 1,25% de Plurônico L121 e 0,2% de polissorbato 80). A microfluidificação é preferida.

[00104] Adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante incompleto de Freund (IFA) também podem ser usado como adjuvantes.

C. Formulações de saponina [capítulo 22 da ref 135]

[00105] Formulações de saponina também podem ser usadas como adjuvantes de conjugados da invenção. Saponinas são um grupo heterólogo de glicosídeos de esterol e glicosídeos de triterpenóide que é encontrado na casca, folhas, caules, raízes e até mesmo nas flores de uma ampla gama de espécies de plantas. A saponina da casca da árvore Molina *Quillaia saponaria* foi amplamente estudada como adjuvante. A saponina também pode ser obtida comercialmente de *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (mosquitinho - brides veil) e *Saponaria officinalis* (saponária - soap root). Formulações adjuvantes de saponina

incluem formulações purificadas, por exemplo, QS21, além de formulações lipídicas, por exemplo, ISCOMs. QS21 é comercializado como Stimulon™.

[00106] As composições de saponina foram purificadas com o uso de HPLC e RP-HPLC. Foram identificadas frações purificadas específicas com o uso dessas técnicas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QHB e QH-C. De preferência, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é revelado na referência 144. As formulações de saponina também podem compreender um esterol, por exemplo, colesterol [145].

[00107] Podem ser usadas combinações de saponinas e colesteróis para formar partículas únicas denominadas complexos imunoestimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 da referência 135]. ISCOMs tipicamente também incluem um fosfolipídeo, por exemplo, fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Qualquer saponina conhecida pode ser usada em ISCOMs. De preferência, o ISCOM inclui um ou mais de QuilA, QHA e QHC. ISCOMs são ainda descritos nas referências 145-147. Opcionalmente, os ISCOMs podem ser desprovidos de detergente adicional [148].

[00108] Uma revisão do desenvolvimento de adjuvantes à base de saponina pode ser encontrada nas referências 149 e 150.

D. Virossomos e partículas semelhantes a vírus

[00109] Virossomos e partículas semelhantes a vírus (VLPs) também podem ser usados como adjuvantes na invenção. Essas estruturas geralmente contêm uma ou mais proteínas de um vírus opcionalmente combinadas ou formuladas com um fosfolipídeo. Eles são geralmente não patogênicos, não se

replicam e geralmente não contêm qualquer um dos genomas virais nativos. As proteínas virais podem ser recombinantemente produzidas ou isoladas de vírus inteiros. Essas proteínas virais adequadas para uso nos virossomos ou VLPs incluem proteínas derivadas de vírus influenza (como HA ou NA), vírus da Hepatite B (como proteínas de núcleo ou capsídeo), vírus da Hepatite E, vírus do sarampo, vírus Sindbis, Rotavírus, vírus da febre aftosa, Retrovírus, vírus Norwalk, Papiloma vírus humano, HIV, fagos de RNA, fago QB (como proteínas *coat*), fago GA, fago fr, fago AP205, e Ty (como retrotransposon Ty proteína p1). VLPs são discutidos também nas refs. 151-156. Virossomos são discutidos também, por exemplo, na ref. 157.

E. Derivados bacterianos ou microbianos

[00110] Adjuvantes adequados para uso na invenção incluem derivados bacterianos ou microbianos como derivados não tóxicos de lipopolissacarídeo enterobacteriano (LPS), derivados de Lipídeo A, oligonucleotídeos imuno-estimulantes e toxinas de ribosilação de ADP e derivados desintoxicados destes.

[00111] Os derivados não tóxicos de LPS incluem monofosforil lipídeo A (MPL) e MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL é uma mistura de 3 des-O-acilado monofosforil lipídeo A com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Uma forma de "particular pequena" preferida de 3 des-O-acilado monofosforil lipídeo A é revelada na ref. 158. Tais "partículas pequenas" de 3dMPL são pequenas o suficiente para serem filtradas de modo estéril através de uma membrana de 0,22 µm [158]. Outros derivados não tóxicos incluem imitadores de monofosforil lipídeo A, como derivados de aminoalquil

glicosaminida fosfato, por exemplo, RC-529 [159,160].

[00112] Os derivados de lipídeo A incluem derivados de lipídeo A de *Escherichia coli* como OM-174. OM-174 é descrito, por exemplo, nas refs. 161 e 162.

[00113] Oligonucleotídeos imuno-estimulantes adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem sequências de nucleotídeos que contêm um motivo CpG ((uma sequência dinucleotídica que contém uma citosina não metilada ligada por uma ligação fosfato a uma guanossina). RNA de fita dupla e oligonucleotídeos que contêm uma sequência palindrômica, ou sequências poli(dG) também se mostraram imuno-estimulantes.

[00114] Os CpG's podem incluir modificações/análogos nucleotídicos, por exemplo, modificações de fosforotioato, e podem ser de fita dupla ou de fita simples. As Referências 163, 164 e 165 revelam substituições análogas possíveis, por exemplo, substituição de guanossina com 2'-desoxi-7-deazaguanossina. O efeito adjuvante de oligonucleotídeos CpG é ainda discutido nas Referências 166-171.

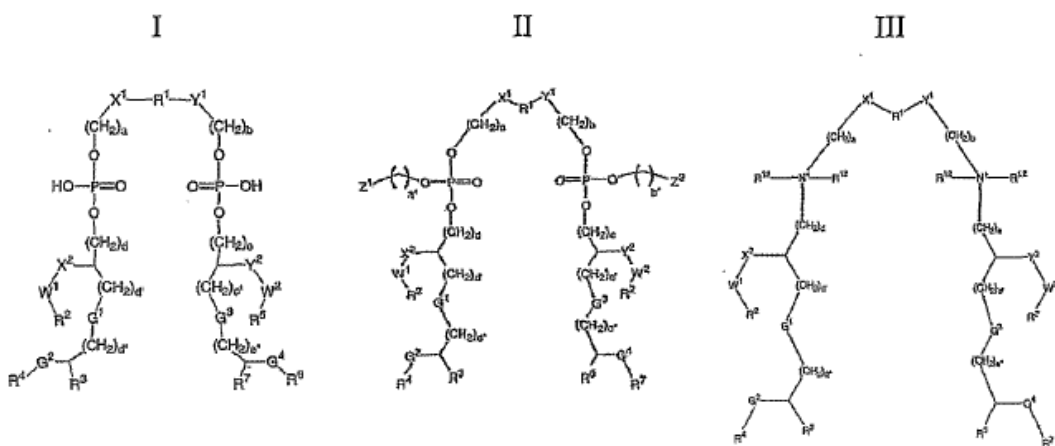
[00115] A sequência CpG pode ser dirigida a TLR9, por exemplo, o motivo GTCGTT ou TTCGTT [172]. A sequência CpG pode ser específica para a indução de uma resposta imunológica Th1, por exemplo, um ODN CpG-A, ou ela pode ser mais específica para indução de uma resposta de células B, por exemplo, ODN CpGB. ODNs CpG-A e CpG-B são discutidos nas referências 173-175. De preferência, o CpG é um ODN CpG-A.

[00116] De preferência, o oligonucleotídeo CpG é construído de modo que a extremidade 5' esteja acessível

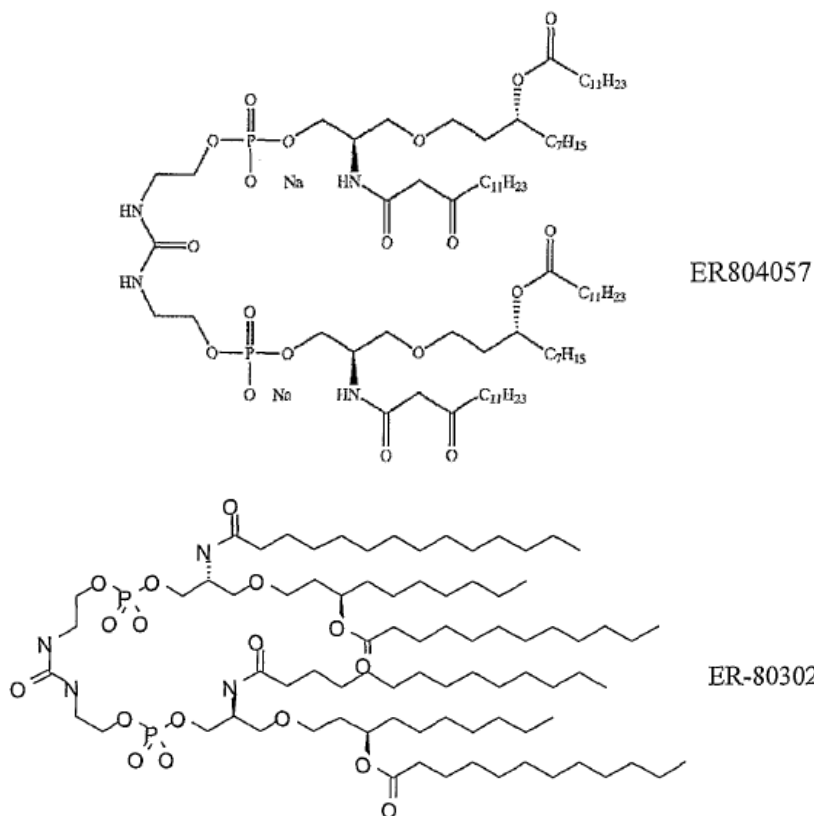
para reconhecimento do receptor. Opcionalmente, duas sequências de oligonucleotídeos CpG podem ser anexadas em suas extremidades 3' para a formação de "imunômeros". Veja, por exemplo, as Referências 172 e 176-178.

[00117] Toxinas de ribosilação de ADP bacteriano e derivados desintoxicados destas podem ser usados como adjuvantes na invenção. Preferivelmente, a proteína é derivada de *E. coli* (a enterotoxina instável em calor de *E. coli* "LT"), toxina colérica ("CT"), ou toxina de pertussis ("PT"). O uso de toxinas de ribosilação de ADP desintoxicadas como adjuvantes de mucosa é descrito na ref. 179 e como adjuvantes parenterais na ref. 180. A toxina ou toxóide está preferivelmente na forma de uma holotoxina, que compreende tanto subunidades A quanto B. Preferivelmente, a subunidade A contém uma mutação desintoxicada; preferivelmente a subunidade B não é mutada. Preferivelmente, o adjuvante é um mutante LT desintoxicado como LT-K63, LT-R72 e LT-G192. O uso de toxinas de ribosilação de ADP e derivados desintoxicados destas, particularmente LT-K63 e LT-R72, como adjuvantes pode ser encontrado nas refs. 181-188. Referência numérica para substituições de aminoácidos é preferivelmente baseada no alinhamento de subunidades A e B de toxinas de ribosilação de ADP apresentadas na ref. 189, especificamente aqui incorporadas em sua totalidade por referência.

[00118] Os Compostos de formula I, II ou III, ou sais destes, também podem ser usados como adjuvantes:



803732", "ER 804053", "ER 804058", "ER 804059", "ER
804442", "ER 804680", "ER 804764", ER 803022 ou "ER
804057", por exemplo:



F. Imunomoduladores humanos

[00119] Imunomoduladores humanos adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem citocinas, como as interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [191], IL-23, IL-27 [192] etc.) [193],

interferons (por exemplo, interferon- γ), fator estimulante de colônia de macrófagos, fator de necrose tumoral e proteína-1-alfa inflamatória de macrófagos (MIP-1alpha) e MIP-1beta [194].

G. Bioadesivos e mucoadesivos

[00120] Bioadesivos e mucoadesivos também podem ser usados como adjuvantes na invenção. Bioadesivos adequados incluem microesferas de ácido hialurônico esterificado [195] ou mucoadesivos como derivados entrecruzados de ácido poli(acrílico), álcool polivinílico, polivinil pirolidona, polissacarídeos e carboximetilcelulose. Quitosana e derivados desta também podem ser usados como adjuvantes na invenção [196].

H. Micropartículas

[00121] Micropartículas também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Micropartículas (ou seja, uma partícula de ~100nm a ~150 μ m de diâmetro, mais preferivelmente ~200 nm a 30 μ m de diâmetro, e mais preferivelmente ~500 nm a 10 μ m de diâmetro) formadas a partir de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (por exemplo, um ácido poli(α -hidroxi), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona etc.), com poli(lactida-co-glicolida) são preferidas, opcionalmente tratadas para terem uma superfície negativamente carregada (por exemplo, com SDS) ou uma superfície positivamente carregada (por exemplo, com um detergente catiônico, como CTAB).

I. Lipossomos (Capítulos 13 e 14 da ref. 135)

[00122] Exemplos de formulações de lipossomos adequadas para uso como adjuvantes são descritos nas

referências 197-199.

J. Formulações de éteres de polioxietileno e ésteres de polioxietileno

[00123] Adjuvantes adequados para uso na invenção incluem éteres de polioxietileno e ésteres de polioxietileno [200]. Tais formulações também incluem tensoativos de éster de polioxietileno sorbitano em combinação com um octoxinol [201] bem como tensoativos de éster ou éteres de polioxietileno alquil em combinação com pelo menos um tensoativo não iônico adicional, como um octoxinol [202].

[00124] Éteres de polioxietileno preferidos são selecionados do seguinte grupo: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), polioxietileno-9-esteoril éter, polioxietileno-8-esteoril éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter e polioxietileno-23-lauril éter.

K. Polifosfazeno (PCPP)

[00125] Formulações de PCPP (poli[di(carboxilatofenoxy) fosfazeno]) são descritas, por exemplo, nas refs. 203 e 204.

L. Muramil peptídeos

[00126] Exemplos de muramil peptídeos adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) e N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").

M. Compostos de imidazoquinolona.

[00127] Exemplos de compostos de imidazoquinolona

adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem Imiquamod e seus homólogos (por exemplo, "Resiquimod 3M"), descritos também nas refs. 205 e 206.

N. Compostos de tiosemicarbazona.

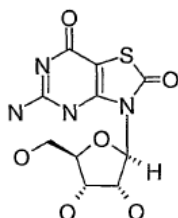
[00128] Exemplos de compostos de tiosemicarbazona, bem como métodos de formulação, manufatura e rastreamento por compostos, todos adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem aqueles descritos na ref. 207. As tiosemicarbazonas são particularmente eficazes no estímulo de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas para a produção de citocinas, como TNF- α .

O. Compostos de triptantrina.

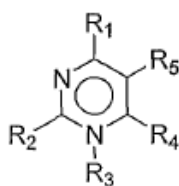
[00129] Exemplos de compostos de triptantrina, bem como métodos de formulação, manufatura e rastreamento para compostos, todos adequados para uso como adjuvantes na invenção, incluem aqueles descritos na ref. 208. Os compostos de triptantrina são particularmente eficazes no estímulo de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas para a produção de citocinas, como TNF- α .

P. Análogos de nucleosídeo

[00130] Vários análogos de nucleosídeo podem ser usados como adjuvantes, como (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia8-oxoguanosina):



e pró-fármacos destes; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) os compostos revelados nas referências 209 a 211; (f) um composto que tem a fórmula:

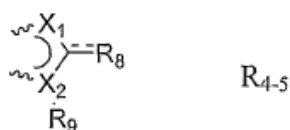


em que:

R_1 e R_2 são independentemente H, halo, $-NR_aR_b$, $-OH$, C_{1-6} alcoxi, C_{1-6} alcoxi substituído, heterociclil, heterociclil substituído, C_{6-10} aril, C_{6-10} aril substituído, C_{1-6} alquil, ou C_{1-6} alquil substituído;

R_3 é ausente, H, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, C_{6-10} aril, C_{6-10} aril substituído, heterociclil, ou heterociclil substituído;

R_4 e R_5 são independentemente H, halo, heterociclil, heterociclil substituído, $-C(O)-R_d$, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, ou ligados juntos para formar um anel de cinco membros como em R_{4-5}

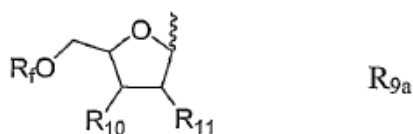


a ligação sendo realizada nas ligações indicadas por um 

X_1 e X_2 são independentemente N, C, O, ou S;

R_8 é H, halo, $-OH$, C_{1-6} alquil, C_{2-6} alquenil, C_{2-6} alquinil, $-OH$, $-NR_aR_b$, $-(CH_2)_n-O-R_c$, $-O-(C_{1-6} \text{ alquil})$, $-S(O)_pR_e$, ou $-C(O)-R_d$;

R_9 é H, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, heterociclil, heterociclil substituído ou R_{9a} , em que R_{9a} é:



a ligação sendo realizada na ligação indicada por um 

R_{10} e R_{11} são independentemente H, halo, C_{1-6} alcoxi, C_{1-6} alcoxi substituído, $-NR_aR_b$, ou $-OH$;

cada R_a e R_b é independentemente H, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, $-C(O)R_d$, C_{6-10} aril;

cada R_c é independentemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, C_{1-6} alquil, ou C_{1-6} alquil substituído;

cada R_d é independentemente H, halo, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, C_{1-6} alcoxi, C_{1-6} alcoxi substituído, $-NH_2$, $-NH(C_{1-6}$ alquil), $-NH(C_{1-6}$ alquil substituído), $-N(C_{1-6}$ alquil) $_2$, $-N(C_{1-6}$ alquil substituído) $_2$, C_{6-10} aril, ou heterociclil;

cada R_e é independentemente H, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, C_{6-10} aril, C_{6-10} aril substituído, heterociclil, ou heterociclil substituído;

cada R_f é independentemente H, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído,, $-C(O)R_d$, fosfato, difosfato ou trifosfato;

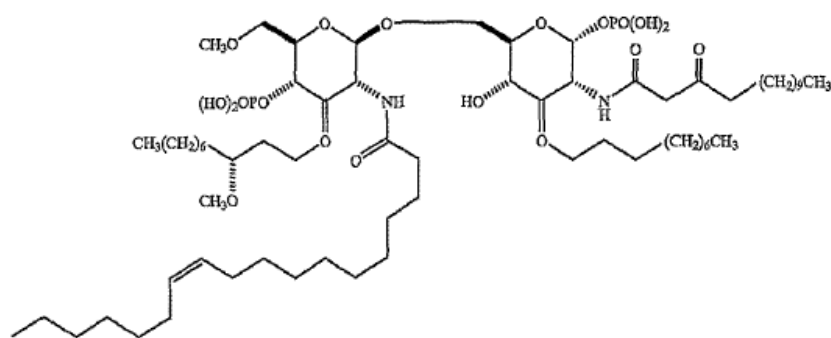
cada n é independentemente 0, 1, 2 ou 3;

cada p é independentemente 0, 1 ou 2; ou

(g) um sal farmaceuticamente aceitável de qualquer um de (a) a (f), um tautômero de qualquer um de (a) a (f), ou um sal farmaceuticamente aceitável do tautômero.

Q. Lipídeos ligados a uma estrutura acíclica que contém fosfato

[00131] Adjuvantes que contêm lipídeos ligados a uma estrutura acíclica que contém fosfato incluem o antagonista de TLR4 E5564 [212,213]:



R. Imunopotenciadores de molécula pequena (SMIPs) incluem:

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
- 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
- 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-

2-il](metil)amino]etanol;

- 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etil acetato;

- 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona;

- N2-butil-1-(2-metilpropyl)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5c]quinolina-2,4-diamina;

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5c]quinolina-2,4-diamina;

- 1-{4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-2-metilpropan-2-ol;

- 1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol;

- N4,N4-dibenzil-1-(2-methoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

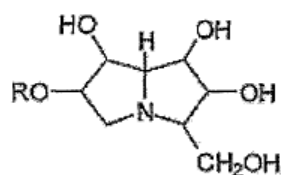
S. Proteossomos

[00132] Um adjuvante é uma preparação de proteossomo de proteína de membrana externa preparada a partir de uma primeira bactéria Gram-negativa em combinação com uma preparação lipossacarídea derivada de uma segunda bactéria Gram-negativa, em que o proteossomo de proteína de membrana externa e preparações lipossacarídeas formam um complexo de adjuvante não covalente estável. Tais complexos incluem "IVX-908", um complexo que compreende membrana externa de *Neisseria meningitidis* e lipopolissacarídeos. Eles têm sido usados como adjuvantes para vacinas de influenza [214].

T. Outros adjuvantes

[00133] Outras substâncias que agem como agentes imuno-estimulantes são reveladas nas referências 135 e 215. Substâncias adjuvantes úteis adicionais incluem:

- Metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") [216].
- um composto de pirrolizidina polihidroxilado [217], como um que tem a fórmula:



em que R é selecionado do grupo que compreende hidrogênio, grupos acil, alquil (por exemplo, cicloalquil), alquenil, alquinil e aril linear ou ramificado, não substituído ou substituído, saturado ou insaturado, ou um sal ou derivado farmacologicamente aceitável destes.

[00134] Exemplos incluem, sem limitação: casuarina, casuarina-6- α -D-glicopirranose, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepi-casuarina etc.

- Uma gama inulina [218] ou derivado desta, por exemplo, algamulina.
- Compostos revelados na referência 219.
- Compostos revelados na referência 220, incluindo: compostos de Acilpiperazina, compostos de Indoldiona, compostos de Tetrahidraisoquinolina (THIQ), compostos de Benzociclodiona, compostos de Aminoazavinil, compostos de Aminobenzimidazol quinolinona (ABIQ) [221,222], compostos de Hidraftalamida, compostos de Benzofenona, compostos de Isoxazol, compostos de esteroi, compostos de quinazilina, compostos de pirrol [223], compostos de antraquinona,

compostos de Quinoxalina, compostos de Triazina, compostos de Pirazalopirimidina, e compostos de Benzazol [224].

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [225].

[00135] Uma formulação de um lipídeo catiônico e um co-lipídeo (normalmente neutro), por exemplo, aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanamínio brometo-diftanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") ou aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanamínio brometo-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE: DOPE"). Formulações que contêm sais de $(\pm)$ -N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(sin-9-tetradeceneiloxi)-1-propanamínio são preferidas [226].

[00136] A invenção também pode compreender combinações de aspectos de um ou mais dos adjuvantes identificados acima. Por exemplo, as seguintes combinações podem ser usadas como composições adjuvantes na invenção: (1) uma saponina e uma emulsão óleo-em-água [227]; (2) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado de LPS não tóxico (por exemplo, 3dMPL) [228]; (3) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado de LPS não tóxico (por exemplo, 3dMPL) + um colesterol; (4) uma saponina (por exemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um esterol) [229]; (5) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões óleo-em-água [230]; (6) SAF, contendo 10% esqualano, 0,4% Tween 80™, 5% polímero em bloco pluronic L121, e thr-MDP, microfluidizados em uma emulsão submícron ou rotacionados para gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior. (7) Sistema de adjuvante Ribit™ (RAS), (Bibi Immunochem) contendo 2% esqualeno, 0,2% Tween 80, e um ou mais componentes da parede celular bacteriana do

grupo que consiste em monofosforilipídeo A (MPL), trehalose dimicolato (TDM), e esqueleto de parede celular (CWS), preferivelmente MPL + CWS (Detox™); (8) um ou mais sais minerais (como um sal de alumínio) + um derivado não tóxico de LPS (como 3dMPL); e (9) um ou mais sais minerais (como um sal de alumínio) + um oligonucleotídeo imuno-estimulante (como uma sequência de nucleotídeos que inclui um motivo CpG).

Definições

[00137] O termo “que compreende” engloba “que inclui”, além de “que consiste”, por exemplo, uma composição “que compreende” X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

[00138] O termo “cerca de”, em relação a um valor numérico x , significa, por exemplo, $x \pm 10\%$. Todos os valores numéricos nesta especificação podem ser considerados como sendo qualificados por “cerca de”, a menos que o contexto indique em contrário.

[00139] A palavra “substancialmente” não exclui “completamente”, por exemplo, uma composição que é “substancialmente livre” de Y pode ser completamente livre de Y. Quando necessário, a palavra “substancialmente” pode ser omitida da definição da invenção.

Breve descrição dos desenhos

[00140] Figura 1 mostra a diferença entre as estruturas de repetição em sorotipos de GBS Ia e III.

[00141] Figura 2 mostra as estruturas de repetição de sacarídeos capsulares em GBS sorotipos Ia, Ib, II, III e V.

[00142] Figurea 3 mostra a estruturas de repetição

da forma dessialilada do polissacarídeo capsular de GBS sorotipo V.

[00143] Figura 4 mostra oxidação de periodato de um resíduo de ácido siálico terminal.

[00144] As Figuras 5 e 6 mostram SDS page de purificação de conjugado com hidroxiapatita tipo I e tipo II, respectivamente. Chave de colune: 1-CRM, 3-conjugado bruto, 5-*Flow through* (conjugado), 7-eluido (CRM não conjugado).

[00145] As Figuras 7 e 8 mostram resultados de HPLC para hidroxiapatita tipo I e tipo II, respectivamente. }O primeiro pico é o conjugado CRM197-GBS Tipo III, o segundo pico é CRM197 não conjugado.

Modos para realizar a invenção

EXEMPLO 1

Preparação do conjugado

[00146] Polissacarídeos capsulares purificados de *Streptococcus agalactiae* sorotipos Ia, Ib e III foram conjugados a uma proteína carreadora por oxidação de periodato seguida por aminação redutora. A proteína carreadora era CRM197.

Comparação de purificação por ultrafiltração versus purificação com hidroxiapatita

[00147] Os conjugados foram purificados com o uso de ultrafiltração (usando diafiltração de fluxo tangencial com uma membrana de 100 kDa) ou resina hidroxiapatita (Tipo I ou Tipo II 80gm de resinas, Bio-Rad). Resina de HA Tipo I tem uma maior capacidade de ligação de proteína e melhor capacidade para proteínas ácidas, enquanto Tipo II tem uma menor capacidade de ligação de proteína mas tem melhor

resolução de certas proteínas. CRM197 tem um peso molecular de mais ou menos 60 kDa. Embora a ultrafiltração que usa uma membrana de 100 kDa possa separar conjugados de polissacarídeos de alto peso molecular (como conjugados de sorotipo Ia de mais ou menos 150KDa, resultando em uma massa total de conjugado de mais ou menos 210 kDa) da mistura CRM197 conjugado/não conjugado, ela não pode ser usada para conjugados de peso molecular menor (como conjugados de sorotipo III) que não têm uma diferença suficiente na massa molecular entre a proteína carreadora conjugada e não conjugada.

[00148] Em contraste, experimentos preliminares mostraram que resina hidroxiapatita Tipo I e Tipo II pode ser usada para purificar CRM197 conjugado de não conjugado. O CRM197 não conjugado ligado à resina enquanto a proteína conjugada foi protegida pelo sacarídeo conjugado e assim foi constado no *flow through*.

Teste de vários parâmetros para a purificação de hidroxiapatita

pH

[00149] Um pH de 6,8 é comumente usado para cromatografia com o uso de hidroxiapatita. No entanto, nesse experimento um pH de 7,2 foi usado para assegurar a estabilidade do sacarídeo. Nenhum efeito sobre a eficiência da cromatografia foi observado devido a essa mudança no pH.

Concentração de fosfato

[00150] Diferentes concentrações de fosfato foram testadas para determinar o efeito sobre o rendimento de conjugado purificado. Foi determinado que CRM197 se liga completamente à coluna de hidroxiapatita se a concentração

de fosfato for < 35 mM no material de iniciação e tampão de lavagem de equilíbrio/pós-carga (pH 7,2). Nessas concentrações, os conjugados CRM197-Ia/Ib foram sempre completamente recuperados na coluna *flow through*, enquanto os conjugados CRM197-III foram recuperados com um rendimento de 80-85%.

Volume de lavagem (após carga)

[00151] Devido a alguma interação com a hidroxiapatita, nem todos os conjugados fluíram imediatamente da coluna durante a carga. No entanto, foi constatado que em uma concentração de fosfato de 30 mM, todos os conjugados fluíram através com menos de 1,5 volumes de coluna (CV) de lavagem pós-carga. Assim, o volume de carga foi de 0,6 CV, os próximos 0,4 a 2,2 CV foram coletados e contidos nos conjugados.

Carga da coluna (capacidade)

[00152] Em uma concentração de fosfato de 35 mM, foi constatado que hidroxiapatita foi capaz de seligar completamente a CRM197 em uma proporção de volume de CRM total:volume da coluna de cerca de $< 2,5$ mg CRM por ml de resina. Para reduzir a chance de CRM197 não conjugado estar presente no *flow through*, um menor CRM:volume de coluna de cerca de 1,5 mg CRM por ml de resina pode ser usado.

Processo piloto

[00153] Após esses experimentos, um processo piloto foi determinado com o uso dos seguintes parâmetros:

[00154] Volume da coluna = 4 L (faixa aceitável: > 3 L). A coluna selecionada tinha 20 cm de diâmetro (altura correspondente de cerca de $11 \pm 2,5$ cm).

[00155] Enxágue e equilíbrio da coluna: 5 CV de 400

mM tampão de fosfato de sódio pH 6,8 a 80 cm/h (419 ml/min) mais 5 CV de 35 mM tampão de fosfato de sódio pH 7,2 a 80 cm/h.

[00156] Carga da coluna e coleta do produto: carregar produto (80 cm/h) e então lavar com tampão de equilíbrio; waste *flow-through* até 0,4 CV, coletar produto até 2,2 CV, então waste até 2,9 CV.

[00157] Coluna eluída com 2 CV de 400 mM de tampão de fosfato de sódio pH 6,8 a 80 cm/h para coletar CRM não conjugado ligado à coluna (essa fração não é relevante para o processo).

Comparação de hidroxiapatita Tipo I com hidroxiapatita Tipo II

[00158] Hidroxiapatitas Tipo I e Tipo II purificam o conjugado da mistura com igual eficiência. As Figuras 5 e 6 mostram géis de SDS page para Tipo I e Tipo II respectivamente. Esses géis claramente mostram que nenhum CRM197 não conjugado foi encontrado no *flow through* (linha 5). Como esperado, o CRM197 não conjugado foi encontrado no eluado (linha 7). O material de iniciação (mistura de CRM197 conjugado e não conjugado), *flow through* e eluado foi analisada por SE-HPLC. Dois gráficos do processo de HPLC são vistos nas figuras 7 e 8 para Tipo I e Tipo II respectivamente. Cada figura mostra dois picos distintos que se relacionam ao CRM197 conjugado purificado e não conjugado. Na Figura 7, o pico duplo é o material de iniciação, o primeiro pico é o *flow through* (conjugado purificado) e o segundo pico é o material eluído da resina (CRM197 não conjugado). Na Figura 8, o primeiro pico é o *flow through* (conjugado purificado) e o segundo pico é o

material eluído da resina (CRM197 não conjugado).

EXEMPLO 2

Preparação do conjugado

[00159] Polissacarídeo capsular purificado, dessialilado de *Streptococcus agalactiae* sorotipo V foi conjugado a uma proteína carreadora por oxidação de periodato seguida por aminação redutora. A proteína carreadora era CRM197.

Teste de parametro de carga de coluna para purificação de hidroxiapatita

Carga de coluna

[00160] Em uma concentração de fosfato de 35 mM, foi constatado que a hidroxiapatita era capaz de se ligar completamente a CRM197 em uma proporção de CRM total:volume da coluna de cerca de < 2,5mg CRM por ml de resina. Para reduzir a chance de CRM197 não conjugado estar presente no *flow through*, um menor CRM:volume de coluna de cerca de 1,5 mg CRM por ml de resina pode ser usado.

Processos de teste

[00161] Seguindo esse experimento, vários processos de teste foram determinados com o uso dos seguintes parâmetros:

Parâmetro	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
Altura da coluna (cm)	5,5	12	12,75	12,75
Diâmetro da coluna (cm)	5	1,6	2,6	2,6
volume da coluna (cm)	108	24	68	68
volume carregado (ml)	337	46	154	153
Massa de CRM presente na	5,0	3,5	3,6	3,5

conjugação reação/coluna volume (mg CRM per ml resin)				
volume de <i>Flow through</i> (ml)	750	95	270	245
volume de eluado (ml)	125	28	100	104
Filtração a 0,2 µm do eluado	não	sim	sim	sim

[00162] Os processos de teste foram analisados como se segue:

Parâmetro	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
Concentração de proteína <i>Flow through</i> (µg/ml)	564	691,1	755	789
Concentração de proteína do eluado (µg/ml)	816	474,4	342	245
Concentração de sacarídeo <i>Flow through</i> concentration (µg/ml)	não detectado	832,52	1067,09	1166,29
Concentração de sacarídeo do eluado (µg/ml)	não detectado	159,78	92,35	65,35
Estimativa de % conjugado no eluado (% de proteínas totais)	11,2	não detectado	8,57	6,35
CRM não conjugado em <i>flow through</i> (%de proteínas totais)	16%	não detectado	Não detectável	Não detectável

[00163] Os rendimentos dos processos de teste foram medidos como se segue:

Parâmetro	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
Estimative de CRM não conjugado em bruto (% por SE-HPLC)	29,5	15,1	11,3	8,9
Recuperação de proteína em <i>flow through</i> (% de CRM presente em reação de conjugação)	78,3	77,8	84,5	68,2
Recuperação de proteína em eluado (% de CRM presente em reação de conjugação)	18,9	24,8	14,2	9,0
Recuperação de sacarídeo <i>flow through</i> (% de sacarídeo presente em reação de conjugação)	não detectado	81,7	90,2	96,4
Recuperação de sacarídeo em eluado (% de sacarídeo presente em reação de conjugação)	não detectado	5,8	2,9	2,3

[00164] Esses dados mostram que cromatografia de hidroxiapatita permite a recuperação de mais que 90% do polissacarídeo capsular de GBS dessialiado tipo V conjugado a CRM197 de uma mistura. Embora o teste gere valores por volta de 80%, esses valores são relativos à quantidade total de CRM197 que estava presente na reação de conjugação, 10-25% dos quais permaneceram não conjugados antes da carga na resina hidroxiapatita.

[00165] O material de iniciação (mistura de CRM197

conjugado e não conjugado), *flow through* e eluado foi analisado por SE-HPLC. Como para conjugados de GBS tipo Ia, Ib e III acima discutidos, picos distintos foram observados em relação ao CRM197purificado conjugado e não conjugado. Esse resultado mostra que cromatografia de hidroxiapatita permite remoção essencialmente completa de CRM197 não conjugado do conjugado.

[00166] Sera entendido que a invenção foi descrita por via de of exemplo apenas e podem ser feitas modificações enquanto se permanece entro do escopo e espírito da invenção.

[00167] **REFERÊNCIAS**

- [1] Peltola (2000) Clin Microbiol Rev 13:302-317
- [2] Wuorimaa & Kayhty (2002) Scand J Immunol 56:111-129
- [3] Balmer e cols. (2002) J Med Microbiol 51:717-722
- [4] Alexander e cols. (2000) J Immunol 164:1625-1633
- [5] W099/55730
- [6] Lei e cols. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.
- [7] W00038711; Patente US 6,146.902.
- [8] W094/06467.
- [9] Anônimo (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.
- [10] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- [11] Anderson e cols. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- [12] EP-A-0372501.
- [13] EP-A-0378881.
- [14] EP-A-0427347.
- [15] W093/17712
- [16] W094/03208.
- [17] W098/58668.
- [18] EP-A-0471177.

- [19] W091/01146
- [20] Falugi e cols. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [21] Baraldo e cols. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.
- [22] EP-A-0594610.
- [23] Ruan e cols. (1990) J Immunol 145:3379-3384.
- [24] W00056360.
- [25] Kuo e cols. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [26] W002/091998
- [27] W001/72337
- [28] W00061761.
- [29] W002/34771
- [30] W003/093306
- [31] W004/041157
- [32] W02005002619
- [33] W02005/033148
- [34] W02006/067632
- [35] W003/007985
- [36] Vaccine (ed Plotkin et al) Quarta edição ISBN 0-7216-9688-0
- [37] Wessels e cols. (1990) J Clin Invest 86:1428-33.
- [38] Wessels e cols. (1989) Infect Immun 57:1089-94.
- [39] W02006/082527
- [40] Pedido de Patente US 61/008,941, intitulado "FERMENTATION PROCESSES FOR CULTIVATING STREPTOCOCCI AND PURIFICATION PROCESSES FOR OBTAINING CPS THEREFROM" depositado em 20 de dezembro de 2007.
- [41] W003/080678
- [42] W02006/050341
- [43] Ravenscroft e cols. (1999) Vaccine 17:2802-2816.
- [44] Costantino e cols. (1999) Vaccine 17:1251-1263.

- [45] W02007/000341
- [46] Lees e cols. (1996) Vaccine 14:190-198.
- [47] W095/08348.
- [48] W098/42721
- [49] Patente US 4356170.
- [50] W02006/082530.
- [51] W02007/000342.
- [52] Patente US 4.882.317
- [53] Patente US 4.695.624
- [54] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- [55] EP-A-0208375
- [57] Geyer e cols., Med. Microbiol. Immunol, 165: 171-288 (1979).
- [58] Patente US 4.057.685.
- [59] Patentes US 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [60] Patente US 4.459.286.
- [61] Patente US 4.965.338
- [62] Patente US 4.663.160.
- [63] Patente US 4.761.283
- [64] Patente US 4.356.170
- [65] Lei e cols. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.
- [66] W00038711; Patente US 6.146.902.
- [67] W099/24578
- [68] W099/36544
- [69] W099/57280
- [70] W00022430.
- [71] Tettelin e cols. (2000) Science 287:1809-1815
- [72] W096/29412
- [73] Pizza e cols. (2000) Science 287:1816-1820
- [74] W001/52885 [75] Bjune e cols. (1991) Lancet

338(8775):1093-96

- [76] Fukasawa e cols. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
- [77] Rosenqvist e cols. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333.
- [78] Costantino e cols. (1992) Vaccine 10:691-698.
- [79] Costantino e cols. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- [80] W003/007985.
- [81] W00066791
- [82] W001/64922
- [83] W001/64920
- [84] W003/020756
- [85] W02004/032958
- [86] W02004/048404.
- [87] W098/18931
- [88] W098/18930
- [89] Patente US 6.699.703
- [90] Patente US 6.800.744
- [91] W097/43303
- [92] W097/37026
- [93] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
- [94] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.
- [95] Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
- [96] W002/22167.
- [97] Paoletti e cols., (1990) J Biol Chem 265:18278-83.
- [98] Wessels e cols., (1990) J Clin Invest 86:1428-33.
- [99] Baker e cols., (2004) J Infect Dis 171:879-84.
- [100] W002/34771
- [101] W02005/032582
- [102] W002/094851
- [103] Dale, Vaccine (1999) 17:193-200

- [104] Dale, Vaccine 14(10): 944-948
- [105] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii.
- [106] Ferretti e cols. (2001) PNAS USA 98: 4658-4663.
- [107] W002/18595
- [108] W099/58562
- [109] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107.
- [110] Gustafsson e cols. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- [111] Rappuoli e cols. (1991) TIBTECH9:232-238.
- [112] Kuroda e cols. (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; veja também páginas 1218-1219.
- [113] W003/093306
- [114] Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6
- [115] W02004/041157
- [116] W02005/002619
- [117] Zhu e cols., Vacina (2004) 22:660 - 669
- [118] Price e cols., Infection and Immunity (2004) 71(1):277 – 283)
- [119] Plante e cols., J Infectious Disease (2000) 182:848 – 855)
- [120] W002/079243
- [121] W00037494
- [122] W003/049762
- [123] W003/068811
- [124] W099/28475.
- [125] Anderson (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S59-65.
- [126] Kahn (2000) Curr Opin Pediatr 12:257-262.
- [127] Crowe (1995) Vaccine 13:415-421.
- [128] J Gen Viral. 2004 Nov; 85(Pt 11):3229

- [129] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [130] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [131] Gerlich e cols. (1990) *Vacina* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [132] W098/20734.
- [133] W003/009869
- [134] W001/30390.
- [135] *Vaccine Design*. (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [136] W00023105.
- [137] W090/14837.
- [138] Podda (2001) *Vacina* 19:2673-80.
- [139] Frey e cols. (2003) *Vaccine* 21:4234-7.
- [140] Patente US 6.299.884.
- [141] Patente US 6.451.325.
- [142] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [143] Hariharan e cols. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [144] Patente US 5.057.540.
- [145] W096/33739.
- [146] EP-A-0109942.
- [147] W096/11711.
- [148] W00007621.
- [149] Barr e cols. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [150] Sjolanderet e cols. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [151] Niikura e cols. (2002) *Virology* 293:273-280.
- [152] Lenz e cols. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [153] Pinto e cols. (2003) 3. *Infect* 188:327-338.
- [154] Gerber e cols. (2001) *Virology* 75:4752-4760.

- [155] W003/024480
- [156] W003/024481
- [157] Gluck e cols. (2002) Vaccine 20:B10-B16.
- [158] EP-A-0689454.
- [159] Johnson e cols. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [160] Evans e cols. (2003) Expert Rev Vacinas 2:219-229.
- [161] Meraldi e cols. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
- [162] Pajak e cols. (2003) Vaccine 21:836-842.
- [163] Kandimalla e cols. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.
- [164] W002/26757.
- [165] W099/62923.
- [166] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
- [167] McCluskie e cols. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.
- [168] W098/40100.
- [169] Patente US 6.207.646.
- [170] Patente US 6.239.116.
- [171] Patente US 6.429.199.
- [172] Kandimalla e cols. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
- [173] Blackwell e cols. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- [174] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
- [175] W001/95935.
- [176] Kandimalla e cols. (2003) BBRC 306:948-953.
- [177] Bhagat e cols. (2003) BBRC 300:853-861.
- [178] W003/035836.
- [179] W095/17211.

- [180] W098/42375.
- [181] Beignon e cols. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
- [182] Pizza e cols. (2001) Vaccine 19:2534-2541.
- [183] Pizza e cols. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461
- [184] Schar-ton-Kersten e cols. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.
- [185] Ryan e cols. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
- [186] Partidos e cols. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
- [187] Peppoloni e cols. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.
- [188] Pine e cols. (2002) JControl Release 85:263-270.
- [189] Domenighini e cols. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
- [190] W003/011223.
- [191] W099/40936.
- [192] Matsui M. e cols. (2004) J. Virol 78: 9093.
- [193] W099/44636.
- [194] Lillard JW e cols., (2003) Blood Feb 1;101(3):807-14. Epub 2002 Sep 12.
- [195] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [196] W099/27960.
- [197] Patente US 6.090.406
- [198] Patente US 5.916.588
- [199] EP-A-0626169.
- [200] W099/52549.
- [201] W001/21207.
- [202] W001/21152.
- [203] Andrianov e cols. (1998) Biomaterials 19:109-115.
- [204] Payne e cols. (1998) Adv Drug Delivery Review

31:185-196.

- [205] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [206] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- [207] W004/60308
- [208] W004/64759.
- [209] US 6.924.271.
- [210] US2005/0070556.
- [211] US 5.658.731.
- [212] Wong e cols. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42.
- [213] US2005/0215517.
- [214] W002/072012.
- [215] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [216] Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86.
- [217] W02004/064715.
- [218] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80.
- [219] W02006/002422.
- [220] W02004/87153.
- [221] US 6.605.617.
- [222] W002/18383.
- [223] W02004/018455.
- [224] W003/082272.
- [225] Patente US 5.011.828.
- [226] US-6586409.
- [227] W099/11241.
- [228] W094/00153.
- [229] W098/57659.
- [230] Pedidos de patente europeia 0835318, 0735898 e

0761231.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de purificação de conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora a partir de uma mistura compreendendo proteína carreadora livre e conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora e opcionalmente compreendendo ainda outras proteínas contaminantes, caracterizado por compreender

i) o contato da referida mistura com hidroxiapatita tal que a proteína carreadora se liga à hidroxiapatita enquanto os conjugados não se ligam; e

ii) coleta dos conjugados livres de antígeno sacarídeo-proteína carreadora;

em que o antígeno sacarídeo é um sacarídeo capsular bacteriano.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína carreadora é selecionada a partir de toxóide tetânico, toxóide diftérico, CRM197, proteínas de membrana externa de *N. meningitidis*, proteínas sintéticas, proteínas *heat shock*, proteínas de pertussis, citocinas, linfocinas, hormônios, fatores do crescimento, carreadores de poli-epitopo, proteína D de *H influenzae*, pneumolisina, proteína de superfície pneumocócica PspA, proteínas de captação de ferro, toxina A ou B de *C.difficile* e/ou um poliepítipo carreador como N19.

3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a referida proteína carreadora é toxóide tetânico, toxóide diftérico ou CRM197.

4. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o antígeno sacarídeo tem um peso molecular de 5 kDa ou mais, preferivelmente 50 kDa ou mais.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o antígeno sacarídeo é glicosilado.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o antígeno sacarídeo é de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Y. enterocolitica*, *V. cholerae* ou *S. typhi*.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o antígeno sacarídeo é de *S. agalactiae* serotipos Ia, Ib, II, III e V.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a proteína carreadora é conjugada a antígenos sacarídeos de mais de uma espécie bacteriana.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o antígeno sacarídeo é conjugado a uma proteína carreadora por um ligante.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o referido método é realizado em pH 6,5-7,5, preferivelmente em pH 7,2.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o referido método é realizado em uma concentração de fosfato

de 50 mM ou menos.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a referida hidroxiapatita:

(i) está na forma de um gel,
(ii) tem um tamanho de partícula de 40 µm ou mais,
e/ou

(iii) tem uma capacidade de ligação dinâmica de > 10 mg lisozima por grama.

13. Método de preparação de uma composição farmacêutica caracterizado por compreender o método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, e compreender ainda etapa (iii) de mistura dos referidos conjugados de antígeno sacarídeo-proteína carreadora obtidos na etapa (ii) com um diluente ou carreador farmacêuticamente aceitável.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por compreender ainda a etapa (iv) de mistura do produto da etapa (iii) com um adjuvante.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13 ou reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a composição compreende um ou mais antígenos adicionais.

Figura 1

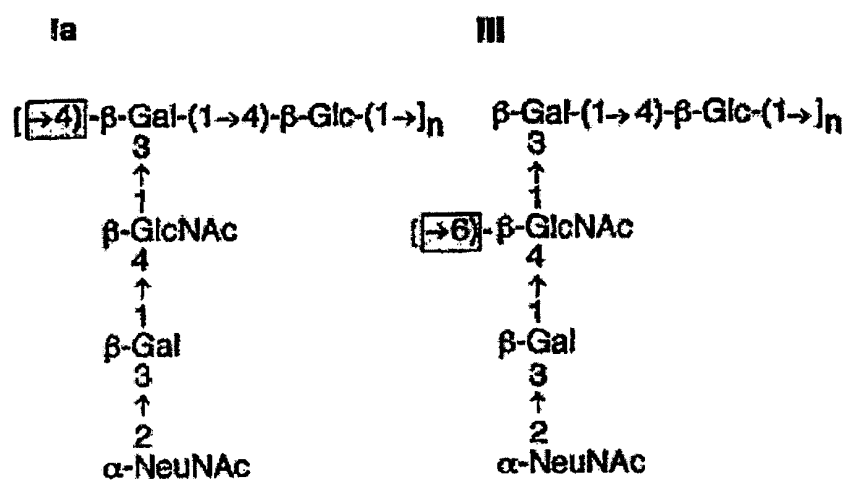


Figura 2

Ia	$ \begin{array}{c} [-\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow)_n \\ \uparrow 3 \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \\ \uparrow 4 \\ 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \\ \uparrow 3 \\ 2 \\ \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $
Ib	$ \begin{array}{c} [-\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow)_n \\ \uparrow 3 \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \\ \uparrow 3 \\ 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \\ \uparrow 3 \\ 2 \\ \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $
II	$ \begin{array}{c} [-\rightarrow 4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 2)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow)_n \\ \uparrow 6 \qquad \qquad \qquad \uparrow 3 \\ 1 \qquad \qquad \qquad 2 \\ \beta\text{-D-Galp} \qquad \qquad \qquad \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $
III	$ \begin{array}{c} \rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 6)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow) \\ \uparrow 4 \\ 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \\ \uparrow 3 \\ 2 \\ \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $
V	$ \begin{array}{c} \rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow) \\ \uparrow 6 \qquad \qquad \qquad \uparrow 3 \\ 1 \qquad \qquad \qquad 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \quad \beta\text{-D-Glcp} \\ \uparrow 4 \qquad \qquad \uparrow 1 \\ 1 \qquad \qquad \qquad 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \\ \uparrow 3 \\ 2 \\ \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $

Figura 3

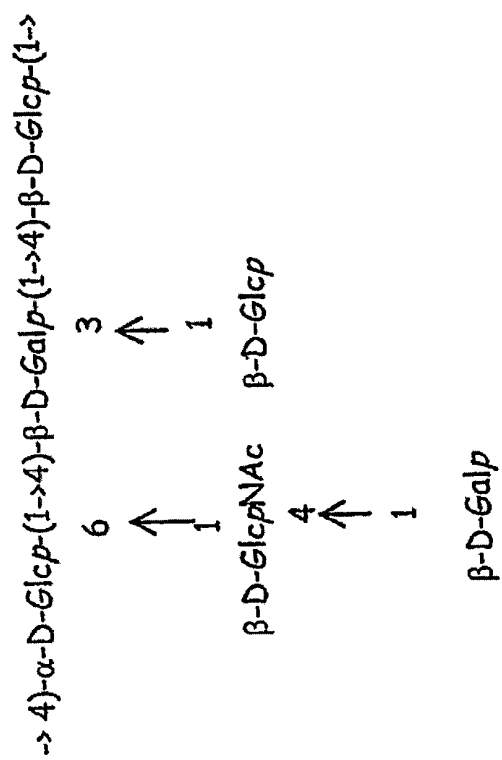


Figura 4

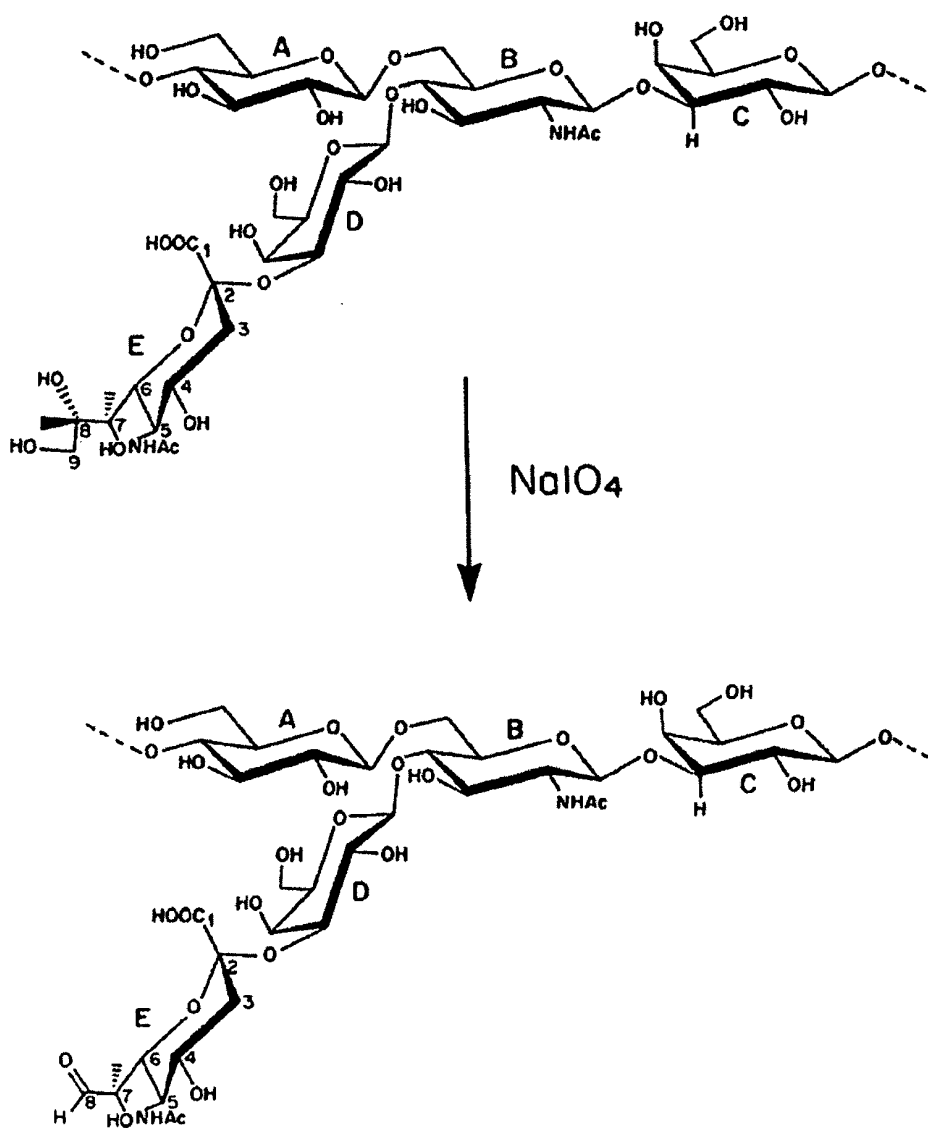


Figura 5

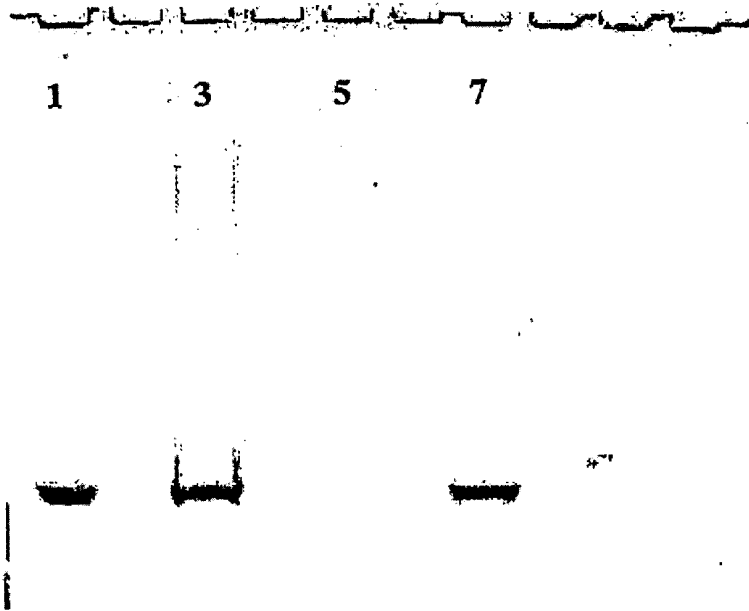


Figura 6

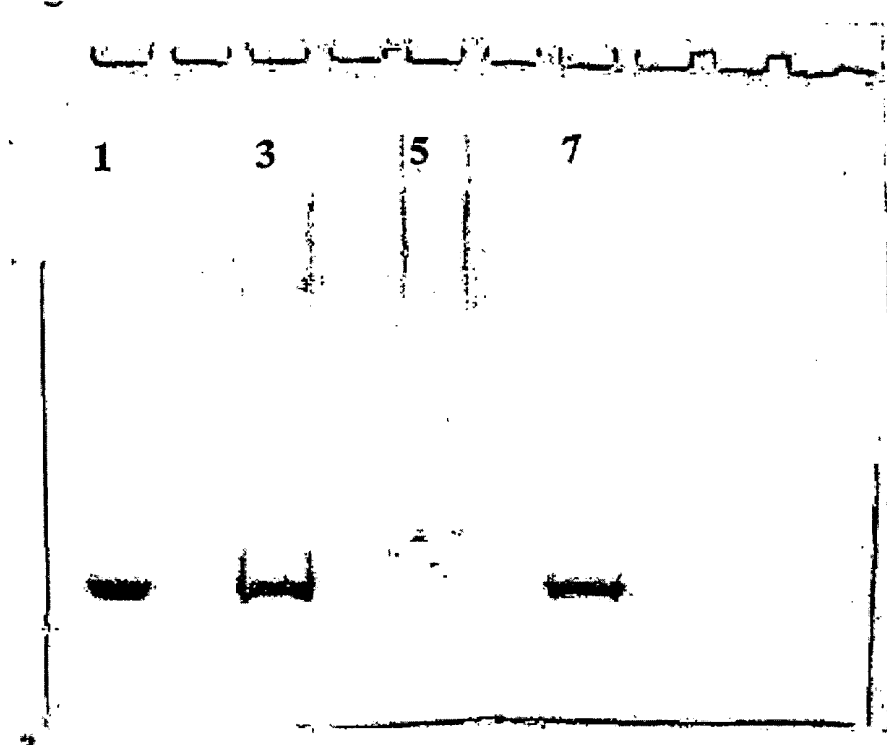
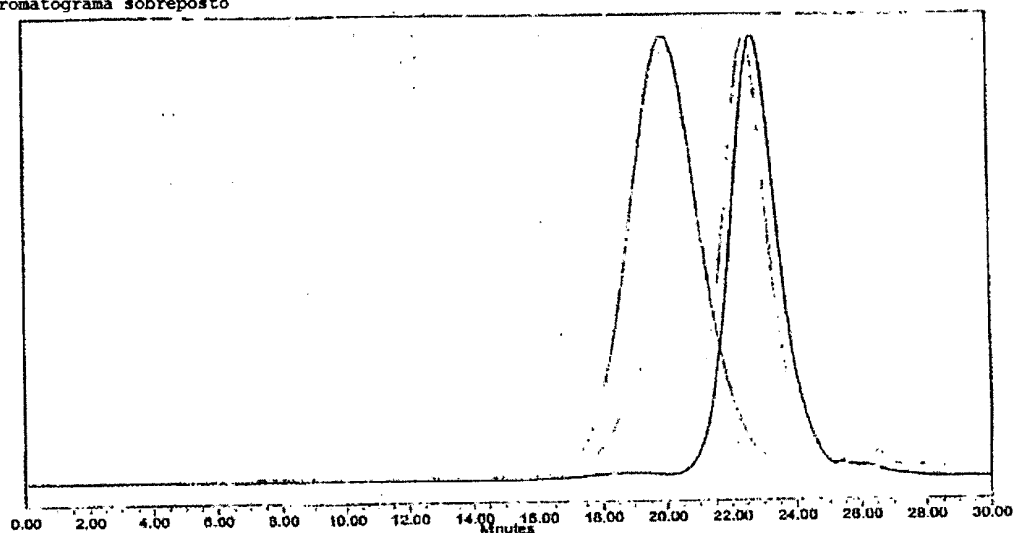


Figura 7

Cromatograma sobreposto



Nome da amostra Eluito HA TR-GGA01 Canal Processado Descr. PDA 280.0 nm Data de aquisição 3/21/07 8:15:19 PM Volume de injeção 200.00
Nome da amostra Non Ass prova 4 CRM-GBS III Canal Processado Descr. PDA 280.0 nm Data de aquisição 3/21/07 6:39:16 PM Volume de injeção 200.00
SampleName SM prova 4 CRM-GBS III Canal Processado Descr. PDA 280.0 nm Data de aquisição 3/21/07 5:51:16 PM Volume de injeção 50.00

Figura 8

