

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2011.03.07	(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridade(s): 2010.03.09 GB 201003922	RUE DE L'INSTITUT, 89 1330 RIXENSART	BE
(43) Data de publicação do pedido: 2013.01.16	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.06.24	RALPH LEON BIEMANS	BE
198/2015	PIERRE DUVIVIER	BE
	OLLIVIER FRANCIS NICOLAS GAVARD	BE
	(74) Mandatário:	
	ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO	
	RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE CONJUGAÇÃO DE POLISSACÁRIDOS BACTERIANOS A PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS**

(57) Resumo:

É AQUI PROPORCIONADO UM PROCESSO PARA A CONJUGAÇÃO DE SACÁRIDOS BACTERIANOS, INCLUINDO SACÁRIDOS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE E HAEMOPHILUS INFLUENZAE POR AMINAÇÃO REDUTORA.

RESUMO

"PROCESSO DE CONJUGAÇÃO DE POLISSACÁRIDOS BACTERIANOS A PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS"

É aqui proporcionado um processo para a conjugação de sacáridos bacterianos, incluindo sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* por aminação redutora.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO DE CONJUGAÇÃO DE POLISSACÁRIDOS BACTERIANOS A PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS"

A presente invenção refere-se a um processo para conjugação. Em particular, esta refere-se à conjugação de sacáridos e proteínas utilizando aminação redutora.

ANTECEDENTES

Os polissacáridos capsulares bacterianos têm sido, desde há muitos anos, bastante utilizados na imunologia, para a prevenção de doença bacteriana. Um problema com essa utilização, contudo, é a natureza independente de T da resposta imunitária. Estes antigénios são, por este motivo, pobremente imunogénicos em crianças pequenas. Este problema tem sido superado através da conjugação dos antigénios de polissacáridos a uma proteína transportadora (uma fonte de epítomos T-auxiliares), os quais podem ser depois utilizados para desencadear uma resposta imunitária dependente de T, mesmo no primeiro ano de vida.

São conhecidas várias técnicas de conjugação na técnica. Os conjugados podem ser preparados por métodos de aminação redutora direta como descrito nos documentos US 200710184072 (Hausdorff) US 4365170 (Jennings) e US 4673574 (Anderson). Outros métodos são descritos nos documentos EP 0161188, EP 208375 e EP 0477508. O método de conjugação pode, em alternativa, depender da ativação de grupos hidroxilo do sacárido com tetrafluoroborato

de 1-ciano-4-dimetilamino piridínio (CDAP) para formar um éster de cianato. Esses conjugados são descritos no pedido PCT publicado WO 93/15760 Uniformed Services University e nos documentos WO 95/08348 e WO 96/29094. Ver também Chu C. *et al.*, Infect. Immunity, 1983 245 256.

A aaminação redutora envolve dois passos, (1) oxidação do antigénio, (2) redução do antigénio e uma proteína transportadora para formar um conjugado. O passo de oxidação pode envolver a reação com periodato, contudo a oxidação por periodato pode levar a redução de tamanho (documento WO 94/05325).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A requerente verificou surpreendentemente que a utilização de baixas concentrações de periodato na presença de baixo fosfato pode levar à retenção de tamanho e/ou à retenção de epítomos.

Num primeiro aspeto da invenção é proporcionado um processo para conjugação de um sacárido ou sacáridos bacterianos compreendendo os passos de

- a) fazer reagir o sacárido bacteriano com 0,001-0,7 (e. g., 0,005-0,5, 0,01-0,5, 0,1-0,5 ou 0,1-0,2) equivalentes molares de periodato para formar um sacárido bacteriano ativado;
- b) misturar o sacárido bacteriano ativado com uma proteína transportadora;

- c) fazer reagir o sacárido bacteriano ativado e a proteína transportadora com um agente redutor para formar um conjugado;

ou

- a) fazer reagir o sacárido bacteriano com 0,001-0,7 (e. g., 0,005-0,5, 0,01-0,5, 0,1-0,5 ou 0,1-0,2) equivalentes molares de periodato para formar um sacárido bacteriano ativado;
- b) misturar o sacárido bacteriano ativado com um ligante;
- c') fazer reagir o sacárido bacteriano ativado com o ligante utilizando um agente redutor para formar um ligante de sacárido bacteriano;
- d) fazer reagir o ligante de sacárido bacteriano com uma proteína transportadora para formar um conjugado;

em que o passo a) ocorre num tampão que não contém um grupo amina e o tampão tem uma concentração entre 1-100 mM.

É divulgado um conjugado obtível pelo processo da invenção.

É divulgado um conjugado obtido processo da invenção.

É divulgada uma composição imunogénica compreendendo o conjugado da invenção e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

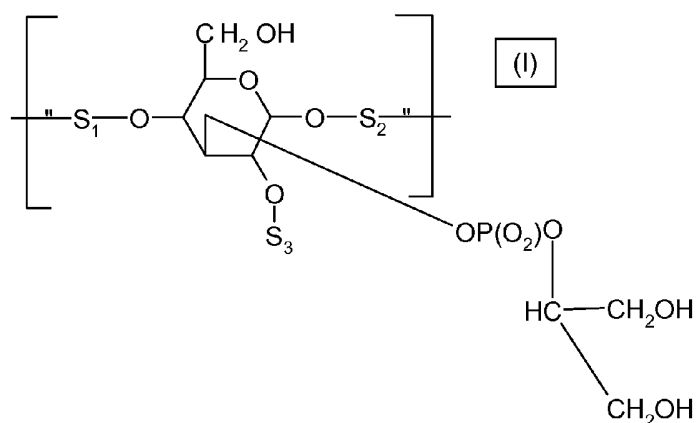
É divulgada uma vacina compreendendo a composição imunogénica da invenção.

É divulgada uma utilização da composição imunogénica da invenção ou da vacina da invenção na prevenção ou tratamento de doença bacteriana.

É divulgada uma utilização da composição imunogénica da invenção ou da vacina da invenção na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de doença bacteriana.

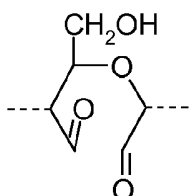
É divulgado um método de prevenção ou tratamento de infeção bacteriana compreendendo a administração da composição imunogénica da invenção ou da vacina da invenção a um doente.

É divulgado um sacárido bacteriano ativado, em que o sacárido bacteriano ativado compreende uma unidade de repetição de fórmula (I):

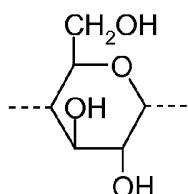


em que o sacárido bacteriano ativado compreende n unidades de repetição e n está entre 2 e 2400, entre 500 e 2000, entre 750 e 1500, entre 1000 e 2000 ou entre 1500 e 2300.

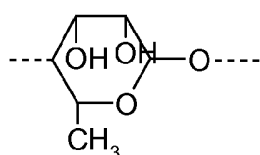
em que, pelo menos, 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10% ou 30% mas menos do que 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 30% ou 50% de S1 é



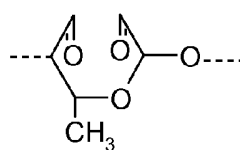
e o restante é



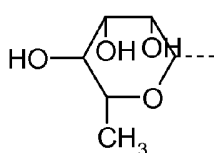
em que S2 é



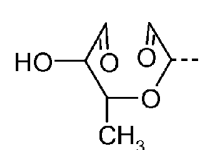
ou



e em que S3 é



ou



DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Tamanho dos polissacáridos 23F e 6B após o tratamento com periodato. A linha marcada com triângulos mostra o tamanho de 6B em tampão fosfato 10 mM, a linha marcada com losangos mostra o tamanho de 23F em tampão fosfato 10 mM e a

linha marcada com quadrados mostra o tamanho de 23F em tampão fosfato 100 mM.

Figura 2. Comparação da imunogenicidade dos conjugados 23F utilizando CDAP ou conjugação por aminação redutora. Gráfico a) descreve os resultados de um ensaio ELISA. Gráfico b) descreve os resultados de um ensaio de opsonofagocitose.

Figura 3. Avaliação da imunogenicidade de PS06B-CRM conjugado utilizando os métodos de conjugação descritos no exemplo 4 num modelo de murganho Balb/c.

Figura 4. Avaliação da imunogenicidade de PS06B-CRM conjugado utilizando os métodos de conjugação descritos no exemplo 4 num modelo de cobaio.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a um processo melhorado para a conjugação de um antígeno a uma proteína transportadora. Em particular, a invenção proporciona um processo para a conjugação de um sacárido ou sacáridos bacterianos compreendendo os passos de

- a) fazer reagir o sacárido bacteriano com 0,001-0,7 equivalentes molares de periodato para formar um sacárido bacteriano ativado;
- b) misturar o sacárido bacteriano ativado com uma proteína transportadora;

- c) fazer reagir o sacárido bacteriano ativado e a proteína transportadora com um agente redutor para formar um conjugado;

ou

- a) fazer reagir o sacárido bacteriano com 0,001-0,7 equivalentes molares de periodato para formar um sacárido bacteriano ativado;
- b) misturar o sacárido bacteriano ativado com um ligante;
- c') fazer reagir o sacárido bacteriano ativado com o ligante utilizando um agente redutor para formar um ligante de sacárido bacteriano;
- d) fazer reagir o ligante de sacárido bacteriano com uma proteína transportadora para formar um conjugado;

em que o passo a) ocorre num tampão que não contém um grupo amina e o tampão tem uma concentração entre 1-100 mM.

O termo "periodato" inclui periodato e ácido periódico. Este termo também inclui o metaperiodato (IO_4^-) e ortoperiodato (IO_6^{5-}), contudo, numa forma de realização particular, o periodato utilizado no método da invenção é metaperiodato. O termo "periodato" também inclui os vários sais de periodato incluindo periodato de sódio e periodato de potássio. Numa forma de realização, o periodato utilizado é metaperiodato de sódio. Quando um antigénio reage com periodato, o periodato oxida os grupos hidroxilo vicinais para formar grupos carbonilo ou aldeído e provoca a clivagem de uma ligação C-C. Por esta razão,

o termo "fazer reagir um antigénio com periodato" inclui a oxidação de grupos hidroxilo vicinais por periodato.

Para os objetivos da invenção, um "sacárido bacteriano ativado" é um sacárido bacteriano que foi ativado pelo passo a) do processo da invenção.

Para os objetivos da invenção, o termo "conjugado" indica um sacárido bacteriano ligado covalentemente a uma proteína transportadora. Numa forma de realização, um sacárido bacteriano está ligado covalentemente a uma proteína transportadora. Numa segunda forma de realização, um sacárido bacteriano está ligado a uma proteína através de um espaçador/ligante.

O tampão utilizado no passo a) é um tampão que não contém um grupo amina. Numa forma de realização, o tampão é selecionado da lista consistindo de tampão fosfato, tampão borato, tampão acetato, tampão carbonato, tampão maleato e tampão citrato. Numa segunda forma de realização, o tampão é um tampão inorgânico. A expressão tampão inorgânico inclui qualquer solução de tampão em que a capacidade de tamponamento é devido à presença de um composto que não contém carbono. Os tampões inorgânicos da invenção incluem tampão fosfato e tampão borato. Numa forma de realização, o tampão é tampão fosfato.

Numa forma de realização, o tampão tem uma concentração entre 1-100 mM, 5-80 mM, 1-50 mM, 1-25 mM, 10-40 mM, 1-10 mM, 5-15 mM, 8-12 mM, 10-20 mM, 5-20 mM, 10-50 mM, cerca de 10 mM ou cerca de 20 mM. Numa forma de realização adicional, o pH no passo a) é pH 2,5-8,0, pH 5,0-7,0, pH 5,5-6,5, pH 5,8-6,3 ou cerca de pH 6,0.

O termo "sacárido" ao longo desta descrição pode indicar polissacárido, ácido teicóico ou oligossacárido e inclui todos os três. Este pode indicar lipopolissacárido (LPS) ou lipooligossacárido (LOS). Antes da utilização, os polissacáridos podem ser isolados de uma estirpe fonte ou isolados da estirpe fonte e dimensionados para algum grau por métodos conhecidos (ver, por exemplo, os documentos EP 497524 e EP 497525; Shousun Chen Szu et al. - Carbohydrate Research Vol. 152 p 7-20 (1986)), por exemplo, por microfluidização. Os oligossacáridos têm um baixo número de unidades de repetição (tipicamente 5-30 unidades de repetição) e são, tipicamente, polissacáridos hidrolisados.

Numa forma de realização, o sacárido bacteriano é um sacárido capsular bacteriano. Numa forma de realização da presente invenção, o sacárido bacteriano tem origem de *Streptococcus* Grupo B, *Vibrio cholera*, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), enterococos, *Salmonella* Vi ou *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). Noutra forma de realização, o sacárido bacteriano tem origem de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, enterococos, *Salmonella* Vi ou *S. epidermidis*. Ainda noutra forma de realização, o sacárido bacteriano é um sacárido capsular bacteriano selecionado de uma lista consistindo de: *N. meningitidis* serogrupo A (MenA), B (MenB), C (MenC), W135 (MenW) ou Y (MenY), *Streptococcus* Grupo B, grupo Ia, Ib, II, III, IV, V, VI ou VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella typhi* (sacárido Vi), *Vibrio cholerae* ou *H. influenzae* tipo b. Numa forma de realização, o sacárido bacteriano é um sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C,

19A, 19F, 20, 22F, 23F ou 33F. Numa forma de realização adicional, o sacárido bacteriano é um sacárido capsular de *S. pneumoniae* selecionado do grupo consistindo de 5, 6B, 6A, 7F, 9V, 14 ou 23F. Opcionalmente, o sacárido bacteriano da invenção é um sacárido capsular de *S. pneumoniae* 23F, 6B ou 6A. Numa forma de realização, o sacárido bacteriano é um sacárido capsular de *S. pneumoniae* 23F. Numa forma de realização, o sacárido bacteriano é um sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6B. Numa forma de realização, o sacárido bacteriano é um sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6A. Ainda numa forma de realização adicional, o sacárido bacteriano é polissacárido ou oligossacárido de *Haemophilus influenzae* b (Hib). Numa forma de realização, o sacárido bacteriano contém anti dióis vicinais.

O sacárido bacteriano pode ser um polissacárido nativo ou pode ter sido reduzida em tamanho por um fator não superior a x2, x4, x6, x8, x10 ou x20 (por exemplo, por microfluidização [e. g., pelo aparelho Emulsiflex C-50] ou outra técnica conhecida [por exemplo, métodos térmicos, químicos, de oxidação, de sonicação]). Numa forma de realização, o sacárido bacteriano é microfluidizado antes do passo a). Os oligossacáridos podem ter sido substancialmente mais reduzidos em tamanho [por exemplo, por métodos térmicos, químicos ou de oxidação conhecidos].

Para os objetivos da invenção, "polissacárido nativo" refere-se a um sacárido bacteriano que não foi submetido a um processo, o objetivo do qual é reduzir o tamanho do sacárido. Um polissacárido pode tornar-se ligeiramente reduzido em tamanho durante os procedimentos de purificação normais. Esse sacárido ainda é nativo. Apenas se o polissacárido tiver sido submetido a

técnicas que reduzem um sacárido em tamanho, se considera que o polissacárido não é nativo.

O peso molecular médio de um sacárido bacteriano adequado para conjugação pelo processo da invenção pode ser entre 20 kDa e 2000 kDa, entre 30 kDa e 1000 kDa, entre 40 kDa e 500 kDa, entre 50 kDa e 400 kDa, entre 75 kDa e 300k Da ou entre 1000 kDa e 2000 kDa. No caso do sacárido capsular nativo 23F de *S. pneumoniae*, o peso molecular médio do polissacárido nativo é entre 750-1500 kDa ou 1200-1300 kDa. No caso do sacárido nativo Hib, o peso molecular médio do polissacárido nativo é entre 100 e 250 kDa. Aqui, o peso molecular ou o peso molecular médio de um sacárido refere-se ao peso molecular médio (Mw) do sacárido bacteriano medido antes da conjugação e é medido por MALLS. A técnica de MALLS é bem conhecida na técnica. Para a análise de MALLS de sacáridos, podem ser utilizadas duas colunas (TSKG6000 e 5000PWx1) em combinação e os sacáridos são eluídos em água. Os sacáridos são detetados utilizando um detetor de espalhamento de luz (por exemplo, Wyatt Dawn DSP equipado com um laser de árgon 10 mW a 488 nm) e um refratómetro interferométrico (por exemplo, Wyatt Otilab DSP equipado com uma célula P100 e um filtro vermelho a 498 nm). As análises de MALLS podem ser realizadas utilizando um TSKGMPwx1 e Na/K PO4 50 mM, NaCl 200 mM pH 7,0 como tampão de eluição com 0,75 mL/min utilizando o detetor RI/DAWN-EOS. Numa forma de realização a polidispersidade do sacárido é 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 ou 1-1,05 e após conjugação a uma proteína transportadora, a polidispersidade do conjugado é 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2, 1,5-2,5, 1,7-2,2 ou 1,5-2,0. Todas as medições de polidispersidade são geradas por MALLS.

O tratamento com periodato pode levar a uma redução no tamanho do sacárido bacteriano (efeito de dimensionamento). Numa forma de realização, o processo da invenção reduz este efeito de dimensionamento. Isto é observado para o sacárido bacteriano 23F de *Streptococcus pneumoniae* (como no exemplo 1). Por esta razão, numa forma de realização, o peso molecular médio de um sacárido bacteriano da invenção é entre 1-1100 kDa, 100-470 kDa, 200-300 kDa, 600-1100 kDa ou 800-1000 kDa após o passo a) (medido por MALLS, como descrito acima). Numa forma de realização, o peso molecular médio do sacárido 23F é entre 100-470 kDa) ou 200-300 kDa após o passo a). Numa forma de realização, o peso molecular médio do sacárido bacteriano de Hib é entre 1 e 50 kDa ou entre 5 e 10 kDa após o passo a).

A expressão "proteína transportadora" destina-se a abranger os péptidos pequenos e os polipéptidos grandes (>10 kDa). A proteína transportadora pode ser qualquer péptido ou proteína. Esta pode compreender um ou mais epítomos T-auxiliares. A proteína transportadora pode ser toxoide tetânico (TT), fragmento C do toxoide tetânico, mutantes não tóxicos da toxina do tétano [notar que todos esses variantes de TT são considerados como sendo o mesmo tipo de proteína transportadora para os objetivos desta invenção], polipéptidos compreendendo epítomos de células T da toxina do tétano, tal como N19 (documento WO 2006/067632), toxoide diftérico (DT), CRM197, outros mutantes não tóxicos da toxina da difteria [tais como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida et al., J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 e CRM107 e outras mutações descritas por Nicholls e Youle em Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; deleção ou mutação de Glu-148 para Asp, Gln ou Ser e/ou Ala 158 para Gly e outras mutações divulgadas nos documentos US 4709017 ou

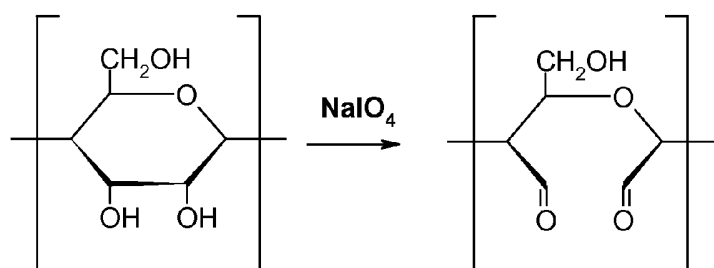
US 4950740; mutação de, pelo menos, um ou mais resíduos Lys 516, Lys 526, Phe 530 e/ou Lys 534 e outras mutações divulgadas nos documentos US 5917017 ou US 6455673; ou fragmento divulgado no documento US 5843711] (notar que todas essas variantes de DT são considerados como sendo o mesmo tipo de proteína transportadora para os objetivos desta invenção), pneumolisina pneumocócica (Kuo *et al.*, (1995) Infect Immun 63; 2706-13), OMPC (proteína da membrana externa meningocócica - normalmente extraída de *N. meningitidis* serogrupo B - documento EP 0372501), péptidos sintéticos (documentos EP 0378881, EP 0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas da pertussis (documentos WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas, fatores de crescimento ou hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiais compreendendo múltiplos epítomos de células T CD4+ humanas de vários antígenos derivados de patógenos (Falugi *et al.*, (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824), tal como a proteína N19 (Baraldoi *et al.*, (2004) Infect Immun 72; 4884-7), proteína de superfície pneumocócica PspA (documento WO 02/091998), proteínas de absorção de ferro (documento WO 01/72337), toxina A ou B de *C. difficile* (documento WO 00/61761), Proteína D de *H. influenzae* (documentos EP594610 e WO 00/56360), PhtA pneumocócica (documento WO 98/18930, também referida como Sp36), PhtD pneumocócica (divulgada no documento WO 00/37105 e é também referida como Sp036D), PhtB pneumocócica (divulgada no documento WO 00/37105 e é também referida como Sp036B) ou PhtE (divulgada no documento WO 00/30299 e é referida como BVH-3).

Numa forma de realização da invenção, a proteína transportadora é selecionada do grupo consistindo de: toxoide tetânico (TT), fragmento C de toxoide tetânico, toxoide diftérico (DT), CRM197, pneumolisina (Ply), proteína D, PhtD,

PhtDE e N19. Numa forma de realização adicional, a proteína transportadora é CRM197. Ainda numa forma de realização adicional, a proteína transportadora é toxoide tetânico (TT).

Numa forma de realização, o passo a) é realizado no escuro.

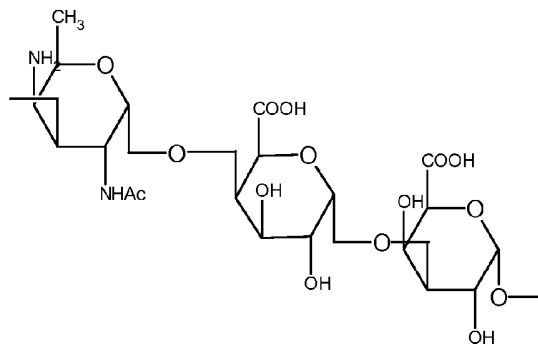
Quando um antigénio reage com periodato, o periodato oxida os grupos hidroxilo vicinais para formar grupos carbonilo ou aldeído e provoca a clivagem de uma ligação C-C. O passo de oxidação (passo a)) pode ocorrer como descrito abaixo:



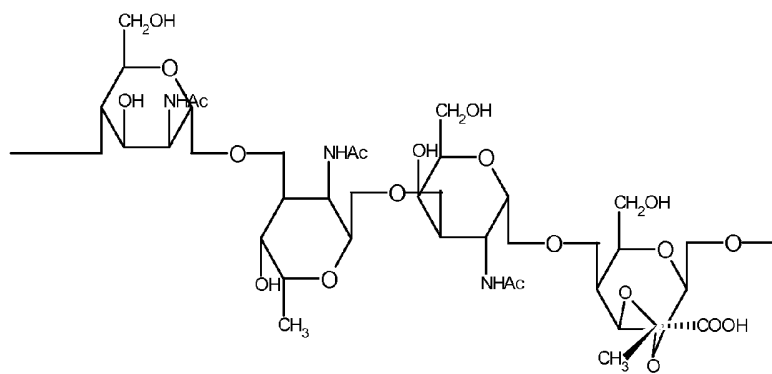
Quando são utilizadas baixas concentrações de tampão, em particular, tampão fosfato e baixas quantidades de periodato, isto pode reduzir o efeito de dimensionamento descrito anteriormente.

Os sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* contêm grupos hidroxilo vicinais que são capazes de ser oxidados por periodato, como se pode observar a partir das estruturas das regiões repetidas mostradas abaixo:

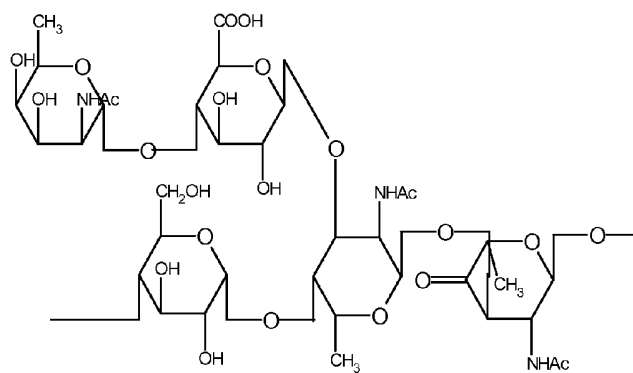
PS1



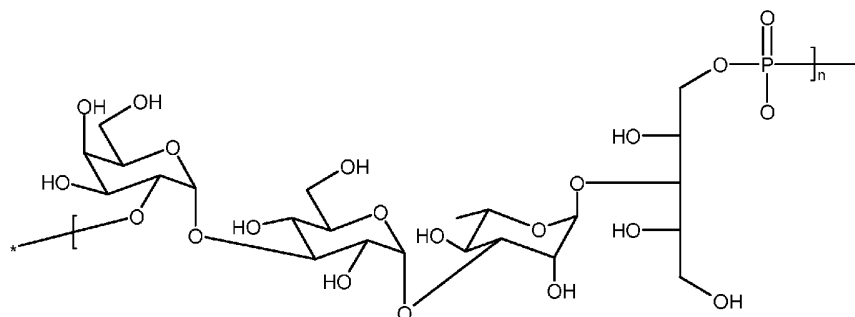
PS2



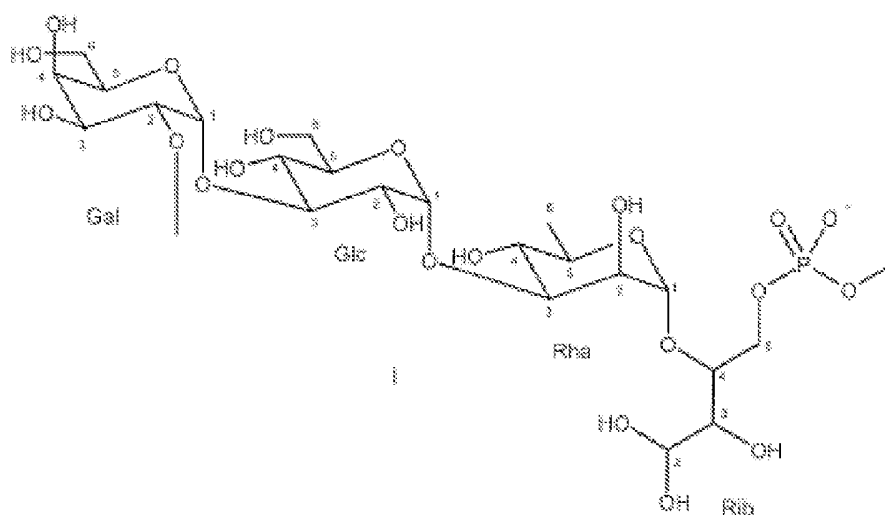
PS5



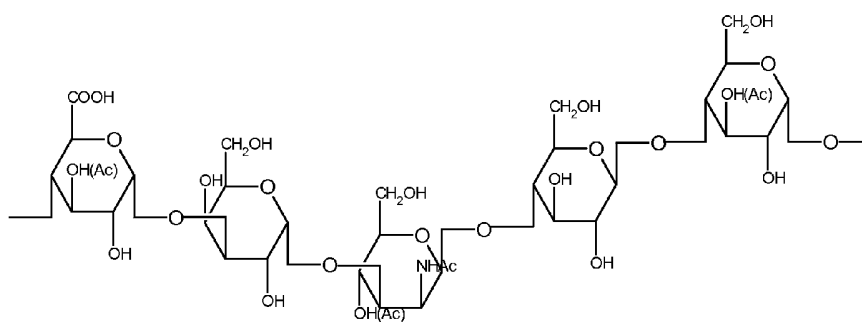
PS 6A



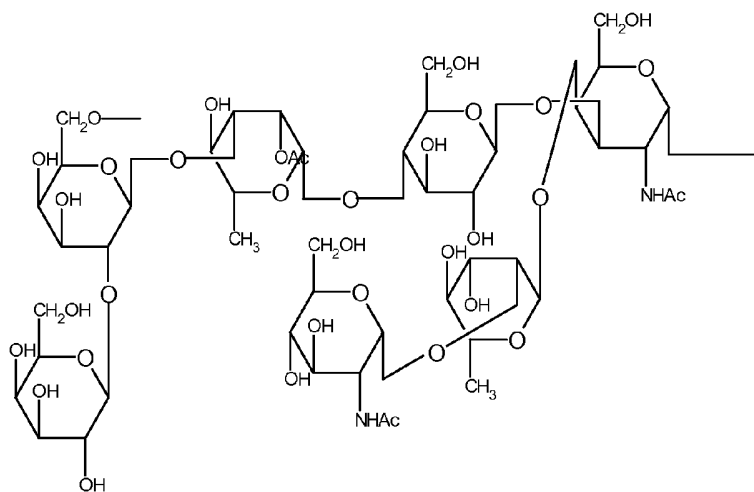
PS 6B



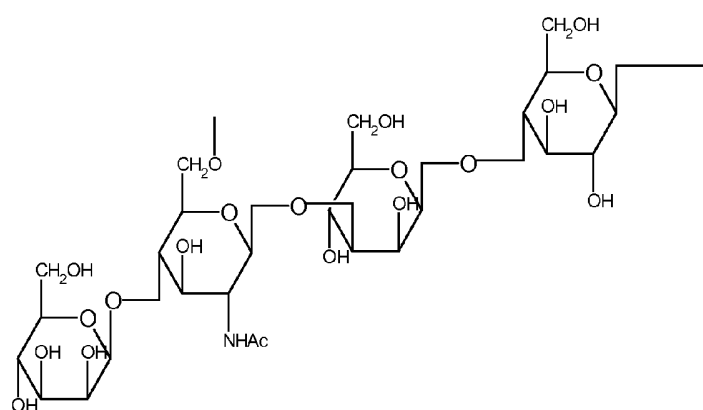
PS9



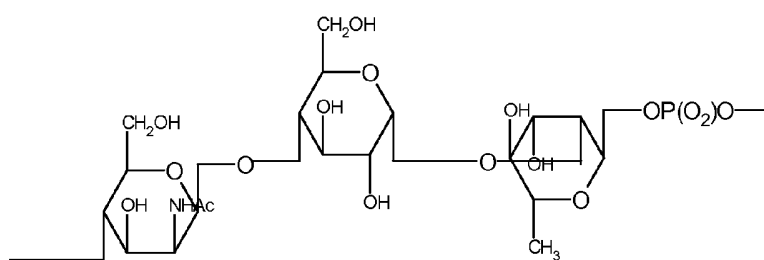
PS7F



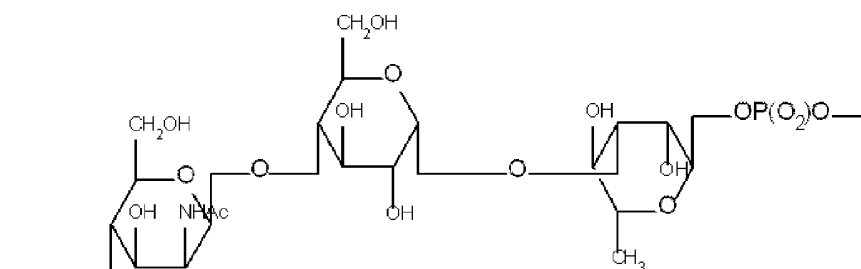
PS14



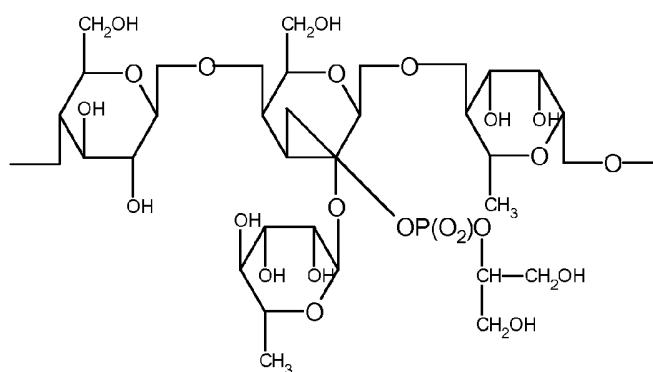
PS19F



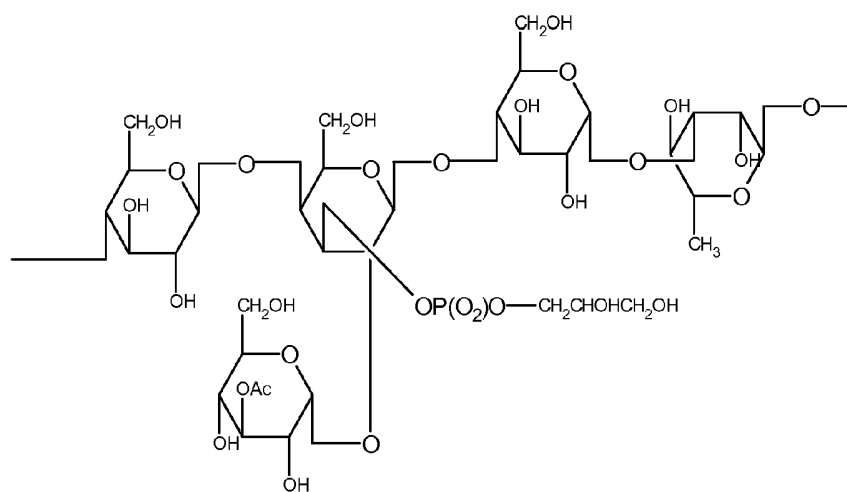
PS19A



PS23F

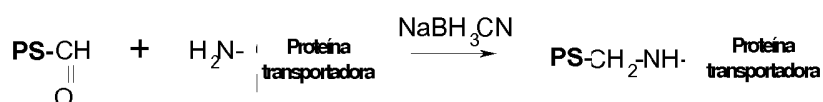


PS18C



Numa forma de realização, menos do que 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 30% ou 50% dos dióis vicinais do sacárido bacteriano torna-se oxidado durante o passo a).

Numa forma de realização, o grupo carbonilo produzido no passo a) reage com um grupo amina na proteína transportadora no passo c). Isto pode ocorrer de acordo com o seguinte esquema de reação:



Numa forma de realização, o sacárido bacteriano está presente a uma concentração de entre 0,2 g/L e 14 g/L 8 g/L e 12 g/L, 10 g/L e 12 g/L, 1 g/L e 4 g/L, 0,2 g/L e 1 g/L ou entre 0,4 g/L e 0,6 g/L ou cerca de 11 g/L ou cerca de 0,5 g/L no passo a). Numa forma de realização, a concentração inicial de proteína transportadora no passo b) é entre 0,5 g/L e 35 g/L, 25 g/L e 35 g/L, 0,5 g/L e 5 g/L ou entre 0,8 g/L e 2 g/L ou cerca de 32 g/L ou 1 g/L. Numa forma de realização adicional, a concentração inicial de sacárido bacteriano ativado no passo b) é entre 0,2 g/L e 20 g/L, 10 g/L e 28 g/L, ou 0,2 g/L e 4 g/L ou entre 1 g/L e 2 g/L ou cerca de 15 g/L ou 1,6 g/L. Numa forma de realização adicional, a razão inicial de sacárido bacteriano ativado para proteína transportadora no passo b) é 2,0:1 para 0,1:1, 1,8:1 para 0,4:1, 1,4:1 para 1,6:1, 1:1 para 1,4:1, 1,8:1 para 1,6:1, 0,8:1 para 0,4:1, 0,7:1 para 0,5:1 ou 0,7:1 para 0,6:1 (p/p). Numa forma de realização adicional, a razão final de proteína transportadora para sacárido bacteriano após o passo c) ou c') é 0,5:1 para 4:1,

0,8:1 para 3,2:1, 0,5:1 para 1,8:1, 1,4:1 para 1,8:1, 1:1 para 1,2:1 ou 2,5:1 para 3,5:1.

Numa forma de realização, a temperatura da reação no passo a) é 4-40 °C, 10-32 °C, 17-30 °C ou 22-27 °C. Tipicamente, esta temperatura é mantida ao longo do passo a). A temperatura de reação durante o passo c) é 4-40 °C, 10-32 °C, 17-30 °C ou 22-27 °C. Tipicamente, esta temperatura é mantida ao longo do passo c).

Numa forma de realização o passo a) do processo da invenção ocorre em menos do que 30 horas, entre 5 e 25 horas, entre 15 e 25 horas, entre 30 minutos e 25 horas, entre 1 hora e 35 horas, entre 10 e 20 horas ou entre 15 e 20 horas, cerca de 18 horas ou cerca de 1 hora. Numa forma de realização, o passo c) do processo da invenção ocorre em entre 10-60 horas, 10-20 horas, 20-60 horas, entre 30-50 horas ou entre 35-45 horas.

A conjugação também pode ocorrer ao longo da adição de um ligante hetero ou homobifuncional utilizando a química da invenção. Uma extremidade do ligante irá reagir com o antigénio ativado por aminação redutora, contudo, a outra extremidade do ligante pode reagir com a proteína transportadora utilizando qualquer tipo de química. Por esta razão, o ligante irá conter, pelo menos, um grupo amino reativo, se o ligante for homobifuncional, este irá conter dois grupos amino reativos, se o ligante for heterobifuncional, este irá conter um grupo amino reativo e um grupo reativo diferente, numa forma de realização, este segundo grupo reativo é um grupo carbonilo reativo. Numa forma de realização, o ligante está entre 1 e 20 Angstroms em comprimento. Numa forma de realização adicional, o ligante tem entre 4 e 20, 4 e 12, ou 5 e 10 átomos de carbono. Um possível

ligante é di-hidrazida de ácido adípico (ADH). Outros ligantes incluem B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever *et al.*, (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), halogenetos de haloalquilo (documento US 4057685), ligações glicosídicas (documentos US 4673574, US 4808700), hexanodiamina e ácido 6-aminocapróico (documento US 4459286).

Em geral, podem ser utilizados os seguintes tipos de grupos químicos na proteína transportadora para acoplamento/conjugação como o segundo grupo reativo:

A) Carboxilo (por exemplo, por meio de ácido aspártico ou ácido glutâmico). Numa forma de realização, este grupo está ligado a um grupo amino num ligante com química de carbodiimida, *e. g.*, com EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)).

Nota: em vez de EDAC acima, pode ser utilizada qualquer carbodiimida adequada.

B) Grupo amino (por exemplo, por meio de lisina). Numa forma de realização, este grupo está ligado a um grupo carboxilo num ligante com química de carbodiimida, *e. g.*, com EDAC. Noutra forma de realização adicional, este grupo está ligado a grupos hidroxilo ativados com CDAP ou CNBr num ligante; a ligantes possuindo um grupo aldeído; a ligantes possuindo um grupo éster de succinimida.

C) Sulfidrilo (por exemplo, por meio de cisteína). Numa forma de realização, este grupo está ligado a um ligante acetilado de bromo ou cloro com química de maleimida. Numa forma de realização, este grupo está ativado/modificado com bisdiazobenzidina.

D) A proteína poderia ser modificada para conter um grupo alquinilo ou azida, esta pode ser conjugada ao ligante utilizando a química de "clique" (descrita em Tetrahedron Letters (junho de 2005) 46:4479-4482).

Nota: em vez de EDAC acima, pode ser utilizada qualquer carbodiimida adequada.

Os agentes redutores que são adequados para utilização no processo da invenção incluem os cianoboro-hidretos, tais como cianoboro-hidreto de sódio, borano-piridina ou resina de permuta de boro-hidreto. Numa forma de realização, o agente redutor é cianoboro-hidreto de sódio. Numa forma de realização, são utilizados entre 0,5 e 2, 0,6 e 1,5 ou 0,8 e 1,2 ou em torno de 1,0 equivalentes molares de cianoboro-hidreto de sódio no passo c). Numa forma de realização adicional, o agente redutor compreende triacetoxiboro-hidreto de sódio, noutra forma de realização, são utilizados entre 2 e 10 ou entre 3 e 9 equivalentes molares ou cerca de 2,5 equivalentes molares de triacetoxiboro-hidreto de sódio no passo c).

Antes do passo c), o sacárido bacteriano ativado e a proteína transportadora podem ser liofilizados. Numa forma de realização, o sacárido bacteriano ativado e a proteína transportadora são liofilizados em conjunto. Isto pode ocorrer antes do passo b) ou após o passo b). Numa forma de realização, a liofilização ocorre na presença de um açúcar não redutor, possíveis açúcares não redutores incluem sacarose, trealose, rafinose, estaquiose, melezitose, dextrano, manitol, lactitol e palatinose. Numa forma de realização adicional, o açúcar não

reductor é selecionado do grupo consistindo de sacarose, trealose ou manitol.

Numa forma de realização, os passos b) e/ou c) são realizados em solvente DMSO (dimetilsulfóxido). Numa forma de realização adicional, os passos b) e/ou c) são realizados em solvente DMF (dimetilformamida). O solvente DMSO ou DMF pode ser utilizado para reconstituir o sacárido bacteriano ativado e a proteína transportadora que foram liofilizados.

No final do passo c) podem existir grupos carbonilo não reagidos que permanecem nos conjugados, estes podem ser capsulados utilizando um agente de capsulação adequado. Numa forma de realização, este agente de capsulação é boro-hidreto de sódio (NaBH_4), por exemplo, o produto do passo c) pode ser feito reagido com boro-hidreto de sódio durante 15 min - 15 h, 15 min - 45 min, 2-10 h ou 3-5 h, cerca de 30 min ou cerca de 4 h. Numa forma de realização adicional, a capsulação é obtida pela mistura do produto do passo c) com cerca de 2 equivalentes molares ou entre 1,5 e 10 equivalentes molares de NaBH_4 .

A invenção proporciona também um passo e) adicional de purificação do conjugado, o passo e) pode compreender diafiltração, por exemplo, diafiltração com um corte a 100 kDa. Além disso ou em alternativa, o passo e) pode compreender cromatografia de permuta iónica. Numa forma de realização adicional, o passo e) pode compreender cromatografia por exclusão de tamanho. Numa forma de realização, o processo das reivindicações 1-51 compreende um passo f) adicional, em que o conjugado é filtrado em estéril.

O conjugado também pode ser misturado com antigénios adicionais. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem, pelo menos, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 sacáridos de *S. pneumoniae* selecionados do grupo consistindo de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14,15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C e 19F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 4, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, e 19F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 7F, 9V, 14,18C, 19F e 23F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14,18C, 19A e 19F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A e 19F. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem os sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F.

Quaisquer dos sacáridos listados como "antigénios adicionais" são opcionalmente conjugados a uma proteína transportadora pelo processo da invenção ou por um processo diferente. Opcionalmente, estes antigénios adicionais são conjugados às proteínas transportadoras listadas acima.

Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 1 conjugado à proteína D ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 3 conjugado à proteína D, CRM197, pneumolisina ou PhtD ou o seu fragmento ou proteína de fusão. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 4 conjugado à proteína D ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 5 conjugado à proteína D ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6B conjugado à proteína D ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 7F conjugado à proteína D ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 9V conjugado à proteína D ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 14 conjugado à proteína D ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 23F conjugado à proteína D ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 18C conjugado ao toxoide tetânico ou CRM197. Numa forma de realização, os antigénios adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 19A

conjugado à pneumolisina ou CRM197. Numa forma de realização, os antígenos adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 22F conjugado a CRM197 ou PhtD ou ao seu fragmento de proteína de fusão. Numa forma de realização, os antígenos adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6A conjugado à pneumolisina ou uma proteína de *H. influenzae*, opcionalmente, proteína D ou PhtD ou a sua proteína de fusão ou CRM197. Numa forma de realização, os antígenos adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6C conjugado à pneumolisina ou uma proteína de *H. influenzae*, opcionalmente proteína D ou PhtD ou a sua proteína de fusão ou CRM197. Numa forma de realização, os antígenos adicionais compreendem o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 19F conjugado ao toxoide diftérico (DT).

Os antígenos adicionais também podem compreender proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Numa forma de realização, os antígenos adicionais compreendem, pelo menos, 1 proteína selecionada do grupo consistindo da família da Tríade de Poli-histidina (PhtX), família das proteínas de Ligação a Colina (CbpX), truncados de CbpX, família de LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas do truncado de CbpX - truncado de LytX (ou fusões), pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 e Sp133.

Os antígenos adicionais também podem compreender antígenos de espécies bacterianas adicionais. Numa forma de realização, a vacina ou composição imunogénica compreende antígenos que têm origem em *S. pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* (*H. Influenzae*), *Neisseria meningitidis* (*N. Meningitidis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*), tétano, difteria, pertussis,

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*), enterococos, *Pseudomonas* ou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Numa forma de realização, os antígenos adicionais compreendem antígenos de *M. cattarhalis*, os antígenos de *M. cattarhalis* preferidos são: OMP106 [documentos WO 97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA & LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA & TbpB [documentos WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1/2 [documento WO 93/03761 (University of Texas)]; e OmpCD. Os exemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* não tipáveis que podem ser incluídos numa vacina de combinação (especialmente para a prevenção de otite média) incluem: proteína Fimbrina [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] e fusões, compreendendo péptidos daí [e. g., fusões de péptido LB1 (f); documento US 5843464 (OSU) ou documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of New York)]; TbpA e TbpB; Hia; Hmwl,2; Hap; e D15.

Numa forma de realização adicional, os antígenos adicionais compreendem componentes de toxoide diftérico (DT), toxoide tetânico (TT) e pertussis [tipicamente toxoide de Pertussis desintoxicada (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) com pertactina opcional (PRN) e/ou aglutinina 1+2], por exemplo, a vacina comercializada INFANRIX-DTPaTM (SmithKlineBeecham Biologicals), a qual contém antígenos de DT, TT, PT, FHA e PRN ou com um componente de pertussis de célula inteira, por exemplo, como comercializado por SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como TritanrixTM. Numa forma de realização adicional, os antígenos adicionais compreendem o antígeno de superfície da Hepatite B (HepB).

Numa forma de realização adicional, os antígenos adicionais compreendem o sacárido capsular PRP de *H. influenzae* (Hib).

Numa forma de realização adicional, os antígenos adicionais compreendem, pelo menos, um sacárido capsular de *N. meningitidis* A, C, W ou Y. Numa forma de realização adicional, os antígenos adicionais compreendem, pelo menos, um conjugado de um sacárido capsular de *N. meningitidis* A, C, W ou Y.

O conjugado também pode ser misturado com um adjuvante. Os adjuvantes adequados incluem, mas não estão limitados a sais de alumínio (fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio), monofosforil lípido A (por exemplo, 3D-MPL), saponinas (por exemplo, QS21), emulsões óleo em água, blebs ou preparações de vesícula de membrana exterior de estirpes bacterianas gram-negativas (tal como aquelas ensinadas pelo documento WO 02/09746), lípido A ou os seus derivados, fosfatos de alquilglucosamida ou as combinações de dois ou mais destes adjuvantes.

Numa forma de realização adicional, o conjugado da invenção é misturado com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Num aspeto adicional da invenção, é proporcionado um conjugado obténivel pelo processo da invenção. Num aspeto adicional da invenção, é proporcionado um conjugado obtido pelo processo da invenção. A invenção também proporciona uma composição imunogénica compreendendo o conjugado da invenção e um excipiente farmacêuticamente aceitável. Numa forma de

realização, o excipiente farmacêuticamente aceitável não contém um sal cloreto, numa forma de realização adicional, o excipiente farmacêutico não contém cloreto de sódio. Numa forma de realização, o excipiente farmacêutico compreende um tampão selecionado do grupo consistindo de maleato, tris ou citrato. Numa forma de realização adicional, o tampão é tampão maleato.

A composição imunogénica da invenção pode compreender antigénios adicionais, em particular, aqueles descritos como "antigénios adicionais" acima. A composição imunogénica pode compreender um adjuvante, particularmente aquele descrito anteriormente.

A invenção também proporciona uma vacina compreendendo a composição imunogénica da invenção.

As preparações de vacina contendo composição imunogénicas da presente invenção podem ser utilizadas para proteger ou tratar um mamífero suscetível a infeção, por meio de administração da referida vacina por meio da via sistémica ou mucósica. Estas administrações podem incluir injeção por meio das vias intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea; ou por meio de administração mucósica aos tratos oral/digestivo, respiratório, geniturinário. A administração intranasal de vacinas para o tratamento de pneumonia ou otite média é possível (uma vez que o transporte nasofaríngeo de pneumococos pode ser mais eficazmente prevenido, atenuando assim a infeção na sua fase mais precoce). Embora a vacina da invenção possa ser administrada como uma única dose, os seus componentes podem também ser coadministrados em conjunto, ao mesmo tempo ou em tempos diferentes (por exemplo, os conjugados sacarídicos pneumocócicos podem ser administrados separadamente, ao mesmo

tempo ou 1-2 semanas após a administração de qualquer componente proteico bacteriano da vacina, para coordenação ótima das respostas imunitárias relativamente uns aos outros). Além de uma única via de administração, podem ser utilizadas 2 vias de administração diferentes. Por exemplo, os sacáridos ou conjugados sacarídicos podem ser administrados IM (ou ID) e as proteínas bacterianas podem ser administradas IN (ou ID). Além disso, as vacinas da invenção podem ser administradas IM para doses de iniciação e IN para doses de reforço.

O conteúdo de antígenos proteicos na vacina será tipicamente na gama de 1-100 µg, opcionalmente, 5-50 µg, muito tipicamente, na gama de 5-25 µg. Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber uma ou várias imunizações de reforço adequadamente espaçadas.

A preparação de vacinas é geralmente descrita em Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powel M.F. e Newman M.J.) (1995) Plenum Press, Nova Iorque). A encapsulação dentro de lipossomas é descrita por Fullerton, Patente U.S. 4235877.

Embora as vacinas da presente invenção possam ser administradas através de qualquer via, a administração das vacinas descritas na pele (ID) constitui uma forma de realização da presente invenção. A pele humana compreende uma cutícula "córnea" externa, denominada o estrato córneo, a qual cobre a epiderme. Debaixo desta epiderme está uma camada denominada a derme a qual, por sua vez, cobre o tecido subcutâneo. Os investigadores mostraram que a injeção de uma vacina na pele e, em particular, na derme, estimula uma resposta imunitária que também pode estar associada com várias vantagens adicionais. A

vacinação intradérmica com as vacinas aqui descritas constitui uma característica opcional da presente invenção.

A técnica convencional da injeção intradérmica, o "procedimento de Mantoux", compreende passos de limpar a pele e depois esticá-la com uma mão e, com o bisel de uma agulha de calibre estreito (calibre 26-31) virado para cima, a agulha é introduzida a um ângulo entre 10-15°. Assim que o bisel da agulha é introduzido, o corpo da agulha é abaixado e adicionalmente avançado enquanto proporciona uma ligeira pressão para elevá-lo sob a pele. O líquido é depois injetado muito lentamente formando assim uma bolha ou um inchaço na superfície da pele, seguida por remoção lenta da agulha.

Mais recentemente, foram descritos dispositivos que são especificamente concebidos para administrar agentes líquidos na pele ou através da pele, por exemplo, os dispositivos descritos nos documentos WO 99/34850 e EP 1092444, também os dispositivos de injeção de jato descritos, por exemplo, nos documentos WO 01/13977; U.S. 5480381, U.S. 5599302, U.S. 5334144, U.S. 5993412, U.S. 5649912, U.S. 5569189, U.S. 5704911, U.S. 5383851, U.S. 5893397, U.S. 5466220, U.S. 5339163, U.S. 5312335, U.S. 5503627, U.S. 5064413, U.S. 5520639, U.S. 4596556, U.S. 4790824, U.S. 4941880, U.S. 4940460, WO 97/37705 e WO 97/13537. Os métodos alternativos de administração intradérmica das preparações de vacina podem incluir seringas e agulhas convencionais ou dispositivos concebidos para distribuição balística de vacinas sólidas (documento WO 99/27961) ou pensos transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); ou aplicados à superfície da pele (distribuição transdérmica ou transcutânea, documentos WO 98/20734; WO 98/28037).

Quando as vacinas da presente invenção são para serem administradas à pele ou, mais especificamente, na derme, a vacina está num pequeno volume de líquido, particularmente um volume entre cerca de 0,05 mL e 0,2 mL.

O conteúdo de antígenos nas vacinas intradérmicas ou para a pele da presente invenção pode ser semelhante a doses convencionais, como verificado em vacinas intramusculares (ver acima). Contudo, é uma característica das vacinas intradérmicas ou para a pele que as formulações possam ser de "dose baixa". Desta forma, os antígenos proteicos em vacinas de "dose baixa" estão presentes, opcionalmente, em tão pouco quanto 0,1 a 10 µg, ou 0,1 a 5 µg por dose; e os antígenos sacarídicos (opcionalmente, conjugados) podem estar presentes na gama de 0,01-1 µg ou entre 0,01 a 0,5 µg de sacárido por dose.

Como aqui utilizada, a expressão "distribuição intradérmica" significa a distribuição de vacina à região da derme na pele. Contudo, a vacina não estará necessariamente localizada exclusivamente na derme. A derme é a camada na pele localizada entre cerca de 1,0 e cerca de 2,0 mm da superfície em pele humana, mas existe uma determinada variação entre indivíduos e em diferentes partes do corpo. Em geral, pode-se esperar alcançar a derme indo 1,5 mm abaixo da superfície da pele. A derme está localizada entre o estrato córneo e a epiderme na superfície e a camada subcutânea abaixo. Dependendo do modo de distribuição, a vacina pode, em última análise, estar localizada unicamente ou essencialmente dentro da derme ou pode, em última análise, estar distribuída dentro da epiderme e da derme.

Num aspeto da invenção é proporcionado um kit de vacina, compreendendo um frasquinho contendo uma composição imunogénica da invenção, opcionalmente na forma liofilizada e compreendendo ainda um frasquinho contendo um adjuvante como aqui descrito. É considerado que, neste aspeto da invenção, o adjuvante irá ser utilizado para reconstituir a composição imunogénica liofilizada.

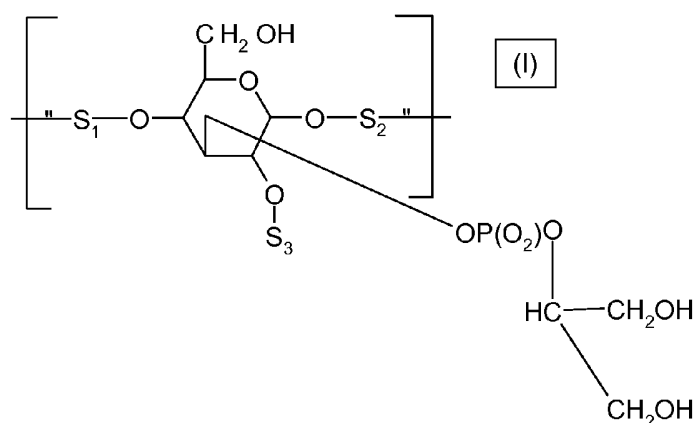
Um aspeto adicional da invenção é um método de imunização de um hospedeiro humano contra infeção por doença bacteriana, compreendendo a administração de uma dose imunoprotectora da composição imunogénica ou vacina ou kit da invenção ao hospedeiro. Um aspeto adicional da invenção é um método de imunização de um hospedeiro humano contra infeção provocada por *S. pneumoniae* e/ou *Haemophilus influenzae*, compreendendo a administração de uma dose imunoprotectora da composição imunogénica ou vacina ou kit da invenção ao hospedeiro.

Um aspeto adicional da invenção é uma composição imunogénica da invenção para utilização no tratamento ou prevenção de doença bacteriana. Um aspeto adicional da invenção é uma composição imunogénica da invenção para utilização no tratamento ou prevenção de doença provocado por infeção por *S. pneumoniae* e/ou *Haemophilus influenzae*.

Um aspeto adicional da invenção é a utilização da composição imunogénica ou vacina ou kit da invenção no fabrico de um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças bacterianas. Um aspeto adicional da invenção é a utilização da composição imunogénica ou vacina ou kit da invenção no fabrico de um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças

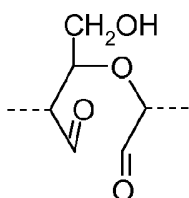
provocadas por infecção por *S. pneumoniae* e/ou *Haemophilus influenzae*.

A invenção também proporciona um sacárido bacteriano ativado, em que o sacárido bacteriano ativado compreende uma unidade de repetição de fórmula (I):

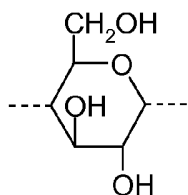


em que o sacárido bacteriano ativado compreende n unidades de repetição e n está entre 2 e 2400, entre 500 e 2000, entre 750 e 1500, entre 1000 e 2000 ou entre 1500 e 2300.

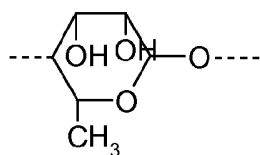
em que, pelo menos, 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10% ou 30% mas menos do que 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 30% ou 50% de S1 é



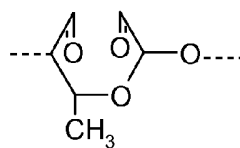
e o restante é



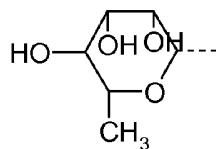
em que S2 é



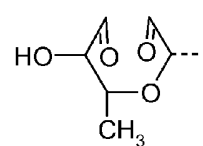
ou



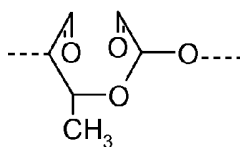
e em que S3 é



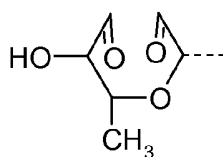
ou



Numa forma de realização, menos do que 0,001%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 30% ou 50% de S2 é



Numa forma de realização, menos do que 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 30% ou 50% de S3 é



"Cerca de" ou "aproximadamente" são definidos como dentro de 10% mais ou menos da figura apresentada, para os objetivos da invenção.

Aqui, os termos "compreendendo", "compreendem" e "compreende", são pretendidos pela requerente como sendo opcionalmente substituíveis com as expressões "consistindo de", "consistem de" e "consiste de", respetivamente, em cada caso.

Aqui, as formas de realização que se relacionam com as "composições de vacina" da invenção são também aplicáveis a formas de realização que se relacionam com as "composições imunogénicas" da invenção e vice-versa.

Todas as referências ou pedidos de patentes citados nesta descrição da patente são aqui incorporados por referência.

De modo a que esta invenção seja melhor compreendida, são apresentados os seguintes exemplos. Estes exemplos são apenas para fins ilustrativos e não são para serem interpretados, de modo algum, como limitativos do âmbito da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Oxidação de 23F e 6B utilizando periodato

Os polissacáridos (PS) 23F ou 6B foram dissolvidos em KH_2PO_4 100 mM (pH 7,4), KH_2PO_4 10 mM ou WFI, para constituir soluções de 2 mg de PS/mL. A solução foi incubada durante 2 horas sob agitação, à temperatura ambiente. Após este tempo, o pH foi ajustado para pH 6,0 com HCl 1 N. Foi adicionado periodato

como um pó ou na forma líquida (10 mg/mL em WFI) em várias quantidades, para obter uma gama de razões molares (tabela 1). As soluções foram incubadas durante 17 horas, à temperatura ambiente (20-25 °C), tempo após o qual as amostras foram dialisadas ou diafiltradas contra WFI.

Foi utilizada cromatografia de filtração de gel de elevado desempenho acoplado a detetores de índice de refração e dispersão de luz laser multiângulo (MALLS-) para medir o peso molecular. Foi utilizado meio de exclusão por tamanho (TSK5000PWXL-Tosoh) para fazer o perfil da distribuição de tamanho molecular do polissacárido (eluição 0,5 mL/min em NaCl 0,2 M - NaN₃ 0,02%).

A tabela 1 e figura 1 descrevem os resultados destas experiências. Estas demonstram que para o sacárido 23F ocorre substancial dimensionamento na oxidação utilizando elevados equivalentes molares de periodato em tampão fosfato 100 mM. Este efeito de dimensionamento pode ser reduzido por redução da concentração de tampão fosfato ou dos equivalentes molares de periodato utilizado.

Tabela 1:

<u>23F</u>				<u>6B</u>			
Amostra	Equivalente molar de periodato	Tampão	Tamanho (KDa)	Amostra	Equivalente molar de periodato	Tampão	Tamanho (KDa)
23F nativo	0	Água	861	6B	0	fosfato 10 mM	1022
23F nativo	0	fosfato 10 mM	847	6B	0,1	fosfato 10 mM	975

(Continuação)

23F				6B			
Amostra	Equivalente molar de periodato	Tampão	Tamanho (KDa)	Amostra	Equivalente molar de periodato	Tampão	Tamanho (KDa)
23F nativo	0	fosfato 100 mM	860	6B	0,2	fosfato 10 mM	990
23F ATCC nativo	0	fosfato 100 mM	1655	6B	0,3	fosfato 10 mM	961
23F	1	fosfato 100 mM	<1	6B	0,75	fosfato 10 mM	868
23F	1	Água	36				
23F	1,2	fosfato 100 mM	<1				
23FATCC	1	fosfato 100 mM	2				
23FATCC	0,125	fosfato 100 mM	39				
23F	0,1	fosfato 10 mM	466,9				
23F	0,15	fosfato 10 mM	398,5				
23F	0,2	fosfato 10 mM	336				
23F	0,5	fosfato 10 mM	179,1				

Exemplo 2 - conjugação de 23F a CRM197 utilizando aminação redutora e química de CDAP

Aminação redutora

Foi dissolvido 1 g de PS23F em 500 mL de KH_2PO_4 10 mM, pH 7,15. Esta solução foi incubada, à temperatura ambiente,

durante duas horas. O pH foi ajustado para 6,0 N com HCl 1 M. Foram adicionados 111 mg de periodato (NaIO_4 , 0,4 equivalentes molares de periodato) à solução de PS23F e a solução foi incubada durante 17 horas no escuro, à temperatura ambiente, para oxidar o PS23F. A solução foi depois diafiltrada contra WFI.

O PS23F ativado foi liofilizado com a proteína CRM197 (a uma razão CRM/PS (p/p): 0,625) na presença de um agente de estabilização.

Foram solubilizados 900 mg da mistura PS23F/CRM197 liofilizada por adição de 350 mL de solvente DMSO e incubados durante 2 horas, à temperatura ambiente. Para reduzir a mistura PS23F/CRM197, foi adicionado 1 equivalente molar de NaBH_3CN (735 μL de uma solução de 100 mg/mL em WFI). A solução foi incubada durante mais 40 horas, à temperatura ambiente, (15 °C - 25 °C) sob agitação. Após este tempo, foram adicionados 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/mL em WFI) e a solução incubada durante 4 horas, à temperatura ambiente. Foram adicionados 2200 mL de NaCl 150 mM antes da diafiltração (corte a 100 kDa) e purificação por DEAE. As frações de interesse foram agrupadas e filtradas através de um filtro de 0,22 μm .

CDAP

Foram dissolvidos 200 mg de PS23F microfluidizado em água, até ser obtida uma concentração de 10 mg/mL. Foi adicionado NaCl a esta solução a uma concentração final de 2 M.

Foi adicionada suficiente solução de CDAP (100 mg/mL recentemente preparados em 5/50 v/v acetonitrilo/WFI) para alcançar uma razão CDAP:PS de 0,75 mg/mg de PS.

Após 90 segundos, o pH foi elevado para pH 9,5 por adição de NaOH 0,1 N. 3 minutos depois foi adicionado suficiente CRM197 (10 mg/mL em NaCl 0,15 M) para alcançar uma razão de 1,5 (CRM197:PS (p/p)), o pH foi mantido a pH 9,5. Esta solução foi incubada durante 1 hora, a pH 9,5.

Após este passo de acoplamento, foram adicionados à mistura 10 mL de solução de glicina 2 M e o pH foi ajustado para pH 9,0 (o pH de mitigação). A solução foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente. O conjugado foi purificado utilizando um filtro de 5 µm seguido por Sephacryl S400HR (XK50/100), o qual remove as moléculas pequenas e polissacáridos não conjugados e proteína. O caudal foi fixo a 150 mL/hora. A eluição foi alcançada utilizando NaCl 150 mM. As frações de interesse foram agrupadas e filtradas utilizando Milipack 20. O conjugado resultante teve uma razão CRM197/PS final (p/p) de 1,35/p.

Exemplo 3 - Imunogenicidade de conjugados 23F-CRM197 preparados por aminação redutora e química de CDAP

Foram preparados conjugados utilizando os métodos descritos no exemplo 2. Cobaias fêmea foram imunizados intramuscularmente três vezes (nos dias 0, 14 e 28) com 0,25 µg dos conjugados PS23F-CRM197. Os animais foram sangrados no dia 42 e a resposta de anticorpo dirigida contra PS23F foi medida por ELISA e OPA.

ELISA

Foram revestidas microplacas com polissacárido pneumocócico purificado em tampão PBS. As placas foram lavadas quatro vezes com NaCl 0,9% e Tween 20 0,05%. Os soros foram incubados durante 1 hora, a 37 °C, com CPS (V/V) em PBS Tween 20 0,05%. Os soros foram adicionados aos micropoços e diluídos em série (passo de diluição dupla) em PBS-Tween 0,05%. As placas foram incubadas sob agitação durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas como acima e foi adicionado um conjugado de peroxidase de anticorpos IgG anti-cobaio, as placas foram depois incubadas durante 30 minutos, à TA. Após a lavagem, o substrato (4 mg de OPDA em 10 mL de citrato 0,1 M pH 4,5 e 5 µL de H₂O₂) foi adicionado a cada poço durante 15 minutos. A reação foi parada por adição de HCl 1 N. A absorvência foi lida a 490-620 nm, utilizando um espectrofotômetro. A cor desenvolvida é diretamente proporcional à quantidade de anticorpo presente no soro. O nível de IgG anti-PS presente nos soros é determinado por comparação com o soro da curva de referência adicionado em cada placa e expresso em µg/mL.

Os resultados foram analisados estatisticamente após se assumir a homogeneidade de variâncias (verificada pelo teste C de Cochrans) e normalidade (verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk). Todas as estatísticas foram realizadas utilizando Anova (Tukey-HSD) sobre a transformação log da concentração de IgG.

Opsonofagocitose

As amostras de soro foram aquecidas durante 45 min a 56 °C, para inativar qualquer complemento endógeno remanescente. Foram diluídas em série alíquotas de vinte e cinco microlitros de cada amostra de soro diluída 1:2 (duas vezes) em 25 µL de tampão OPA (HBSS - FBS 14,4% inativado) por poço de uma placa de microtitulação de fundo redondo de 96 poços. Subsequentemente, foram adicionados aos soros diluídos 25 µL de uma mistura de células HL-60 ativadas (1×10^7 células/mL), cultura de trabalho pneumocócica recentemente descongelada e complemento de coelho bebê recentemente descongelado numa razão de, e. g., 4/2/1 (v/v/v), para produzir um volume final de 50 µL. A placa de ensaio foi incubada durante 2 h, a 37 °C, com agitação orbital (210 rpm), para promover o processo fagocítico. A reação foi parada colocando a microplaca em gelo durante, pelo menos, 1 min. Foi depois transferida uma alíquota de 20 µL de cada poço da placa para o poço correspondente de uma microplaca de fundo plano de 96 poços e foram adicionados a cada poço 50 µL de agar de Caldo de Todd-Hewitt 0,9%. Após a incubação, de um dia para o outro, a 37 °C e CO₂ 5%, as colónias pneumocócicas que apareceram no agar foram contadas utilizando um sistema de análise de imagem automatizada (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Foram utilizados como controlos bacterianos oito poços sem amostra de soro, para determinar o número de pneumococos por poço. O número médio de CFU dos poços de controlo foi determinado e utilizado para o cálculo da atividade de morte para cada amostra de soro. O título de OPA para as amostras de soro foi determinado pela diluição recíproca de soro capaz de facilitar a morte de 50% dos pneumococos. O título opsonofagocítico foi calculado utilizando uma análise de ajuste de curva de 4 parâmetros.

Os resultados foram analisados estatisticamente após se assumir a homogeneidade de variâncias (verificada pelo teste C de Cochrans) e normalidade (verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk). Todas as estatísticas foram realizadas por Anova (Tukey-HSD) sobre a transformação log da concentração IgG para ELISA e Kruskal-Wallis sobre a diluição log para OPA.

Foi induzida uma resposta de anticorpo significativamente mais elevada nos cobaios após imunização com o PS23F-CRM197 conjugado por aminação redutora do que com o PS23F-CRM197 conjugado por química de CDAP, como observado na figura 2.

Tabela 2

Ensaio	23F-CRM197 preparado por aminação redutora	23F-CRM197 preparado por CDAP
Título de ELISA (µg/mL)	213,3	40,5
OPA (morte de 50%)	9232	591

Exemplo 4 - um exemplo adicional de aminação redutora de 23F

23F-CRM-RA-116

Foram dissolvidos 150 mg de PS23F nativo (PS23FP114) a uma concentração de 2 mg/mL em tampão fosfato 10 mM (pH 7,2) durante 4 horas. Após dissolução, o pH foi ajustado para pH 6,0 com HCl 1 N. Depois, foram adicionados 0,4 equivalentes molares de periodato (NaIO_4) à solução de PS e incubados durante 17 h no

escuro, a 25 °C. A solução é depois diafiltrada (corte a 30 kDa) contra WFI e o PS oxidado foi filtrado sobre uma membrana de 0,22 µm.

Foram liofilizados em conjunto 50 mg de PS oxidado e 75 mg de CRM197 (razão CRM/PS (p/p): 1,5/1) na presença de um agente de estabilização. Os PS + CRM197 liofilizados foram solubilizados com 20 mL de DMSO durante 2 h à temperatura ambiente (15-25 °C). Foi depois adicionado 1 equivalente molar de TAB (triacetoxiboro-hidreto de sódio) (13,7 mg) e, após 17 h sob agitação, foram adicionados 2 equivalentes molares de NaBH₄ (100 mg/mL em NaOH 0,1 M), seguido por uma incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos. A solução foi diluída 5x por adição de WFI, seguido por uma diafiltração (corte a 30 kDa) contra tampão fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2. O conjugado foi depois carregado numa resina DEAE e eluído em tampão fosfato 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,2. O conjugado foi, por fim, filtrado sobre 0,22 µm. O conjugado resultante tem uma razão final CRM/PS (p/p) de 2,3/1.

Para conjugados adicionais, foi adicionado um segundo passo de diafiltração após a coluna de DEAE, de modo a alterar o tampão (NaCl 150 mM como tampão final).

Exemplo 5 - conjugação de 6B a CRM197 utilizando aminação redutora (com diferentes razões proteína:sacárido e sacáridos 6B microfluidizados de diferentes tamanhos) e química de CDAP

6B-CRM-RA-122

Foram diluídos 200 mg de PS6B microfluidizado (84 kDa, 11,7 mg/mL) a 2 mg/mL em tampão fosfato 10 mM (pH 7,2). O pH foi ajustado para pH 6,0 com HCl 1 N. Depois, foram adicionados 0,1 equivalentes molares de periodato (NaIO_4) à solução de PS e incubados durante 17 h no escuro, à temperatura ambiente. A solução é depois diafiltrada (corte a 30 kDa) contra WFI. Foram liofilizados em conjunto 50 mg de PS e 30 mg de CRM197 (razão CRM/PS (p/p): 0,6/1) na presença de um agente de estabilização. Os PS + CRM197 liofilizados foram solubilizados com 20 mL de DMSO durante 3 h, à temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 2,5 equivalente molares de TAB (triacetoxiboro-hidreto de sódio) (38,7 mg) e, após 16 h sob agitação, foram adicionados 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/mL em NaOH 0,1 M), seguido por uma incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos. A solução foi diluída 4x por adição de WFI, seguido por uma diafiltração (corte a 100 kDa). O conjugado foi depois filtrado sobre 0,22 μm . O conjugado resultante tem uma razão final CRM/PS (p/p) de 1,1/1.

6B-CRM-RA-123:

O PS6B microfluidizado (84 kDa) foi conjugado a CRM197 como descrito para 6B-CRM-RA-122, exceto que o passo de liofilização foi realizado utilizando uma razão CRM197/PS inicial (p/p) de 2/1 e foram utilizados 30 mL de DMSO para a dissolução no passo

de DMSO (em vez de 20 mL). O conjugado resultante teve uma razão CRM/PS final (p/p) de 3,0/1.

6B-CRM-RA-124:

Foram diluídos 200 mg de PS6B microfluidizado (350 kDa, 11,7 mg/mL) possuindo um peso molecular de 350 kDa para 2 mg/mL em tampão fosfato 10 mM (pH 7,2). O pH foi ajustado para pH 6,0 com HCl 1 N. Depois, foram adicionados 0,1 equivalentes molares de periodato (NaIO_4) à solução de PS e incubados durante 17 h no escuro, à temperatura ambiente. A solução é depois diafiltrada (corte a 100 kDa) contra WFI. Foram liofilizados em conjunto 50 mg de PS e 60 mg de CRM197 (razão CRM/PS (p/p): 1,2/1) na presença de um agente de estabilização. Os PS + CRM197 liofilizados foram solubilizados com 20 mL de DMSO durante 5 h à temperatura ambiente. Foram depois adicionados 2,5 equivalentes molares de TAB (triacetoxiboro-hidreto de sódio) (38,7 mg) e, após 16 h sob agitação, foram adicionados 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/mL em NaOH 0,1 M), seguido por incubação durante 30 min à temperatura ambiente. A solução foi diluída 4x por adição de WFI seguido por uma diafiltração (corte a 100 kDa). O conjugado foi depois filtrado sobre 0,22 μm . O conjugado resultante tem uma razão CRM/PS final (p/p) de 1,6/1.

6B-CRM-RA-125:

O PS6B microfluidizado (350 kDa) foi conjugado a CRM197 como descrito para 6B-CRM-RA-124, exceto que o passo de liofilização foi realizado utilizando uma razão CRM197/PS inicial (p/p) de 2/1 e a dissolução em DMSO foi realizada

utilizando 33 mL (em vez de 20 mL). O conjugado resultante teve uma razão CRM/PS final (p/p) de 2,9/1.

6B-CRM-003:

Foram diluídos 50 mg de PS6B microfluidizado a 10 mg/mL em água (10 mg/mL). Foi adicionado NaCl na forma sólida para obter uma concentração final de 2 M. Foi adicionada solução de CDAP (100 mg/mL recentemente preparados em 50/50 v/v acetoneitrilo/WFI) para obter a razão CDAP/PS apropriada (1,5 mg/mg de PS). Após 1,5 minutos, o pH foi elevado para o pH 9,5 de ativação por adição de NaOH 0,1 N e foi estabilizado a este pH até à adição de CRM197. Após 3 minutos, foi adicionado CRM197 (10 mg/mL em NaCl 0,15 M) para obter uma razão CRM197/IPS (p/p) de 2; o pH foi mantido no acoplamento a pH 9,5. A solução foi deixada durante 2 h sob regulação do pH.

Após o passo de acoplamento, foram adicionados à mistura 2,5 mL da solução de glicina 2 M. O pH foi ajustado para o pH de mitigação (pH 9,0). A solução foi agitada durante 30 min, à temperatura ambiente. Depois, o conjugado foi filtrado utilizando um filtro de 5 µm e injetado numa coluna Sephacryl S400HR (XK26/100) para remover as moléculas pequenas (incluindo DMAP) e PS não conjugado e proteína. O caudal foi fixo a 30 mL/h. A eluição foi realizada em NaCl 150 mM. As frações interessantes foram agrupadas e filtradas sobre Millipack 20. O conjugado resultante teve uma razão CRM197/PS final (p/p) de 1,5/1.

Foi diluído 1 g de PS6B microfluidizado (245 kDa, 9,47 mg/mL) para 2 mg/mL em tampão fosfato 10 mM (pH 7,2). O pH foi ajustado para pH 6,0 com HCl 1 N. Foram depois adicionados 0,1 equivalentes molares de periodato (NaIO_4) à solução de PS e incubados durante 18 h no escuro, à temperatura ambiente. A solução foi depois diafiltrada contra WFI (Sartocon Slice 200 Hydrosart 100 kDa). Foram liofilizados em conjunto 200 mg de PS oxidado e 240 mg de CRM197 (razão CRM/PS (p/p): 1,2/1) na presença de um agente de estabilização. Os PS + CRM197 liofilizados foram solubilizados com 80 mL de DMSO durante 6 h, a 25 °C. Depois, foram adicionados 2,5 equivalentes molares de TAB (triacetoxiboro-hidreto de sódio) (154,9 mg) e, após 16 h sob agitação a 25 °C, foram adicionados 2 equivalente molares de NaBH_4 (100 mg/mL em NaOH 0,1 M) e incubados durante 30 min. A solução foi diluída 5x em WFI e após 30 min foi diafiltrada 10x com NaCl 150 mM e depois 5x com PO_4 (K/K_2) 10 mM pH 7,2 + NaCl 150 mM (Sartorius Sartocon Slice 200 Hydrosart 100 kDa). Depois, o retido foi carregado numa coluna DEAE (XK26/40). A coluna foi lavada com tampão PO_4 (K/K_2) 10 mM pH 7,2/NaCl 150 mM. O conjugado foi eluído com tampão PO_4 (K/K_2) 10 mM pH 7,2/NaCl 500 mM. O eluato foi concentrado e diafiltrado com 5 volumes de NaCl 150 mM e depois filtrado sobre um filtro de 0,22 μm . O conjugado resultante tem uma razão CRM/PS final (p/p) de 1,6/1.

Exemplo 6 - Imunogenicidade de conjugados 6B-CRM197T preparados por aminação redutora e química de CDAP

Grupos de 40 murganhos Balb/c fêmea (4 semanas de idade) foram imunizados intramuscularmente três vezes nos dias 0, 14

e 28, com 0,1 µg de conjugados PS6B produzidos por aminação redutora ou química de CDAP formulada em AlPO_4 . Foi utilizado PS6B-PD como referência. Os murganhos foram sangrados no dia 42 e a resposta de anticorpo dirigida contra cada antígeno foi medida por ELISA e OPA.

Grupos de 20 cobaias fêmea (150 g de Hartley) foram imunizados intramuscularmente três vezes nos dias 0, 14 e 28, com 0,25 µg de conjugados PS6B produzidos por aminação redutora ou química de CDAP adjuvantada com AlPO_4 . Foi utilizado PS6B-PD como referência. Os cobaias foram sangrados no dia 42 e a resposta de anticorpo dirigida contra cada antígeno foi medida por ELISA e OPA.

OPA de Murganhos e Cobaias

As amostras de soro foram aquecidas durante 45 min a 56 °C, para inativar qualquer complemento endógeno remanescente. Foram diluídas em série duas vezes alíquotas de vinte e cinco microlitros de cada amostra de soro diluída 1:2 em 25 µL de tampão OPA (HBSS - FBS 14,4% inativado) por poço de uma placa de microtitulação de fundo redondo de 96 poços. Subsequentemente, foram adicionados aos soros diluídos 25 µL de uma mistura de células HL-60 ativadas (1×10^7 células/mL), cultura de trabalho pneumocócica recentemente descongelada e complemento de coelho bebê recentemente descongelado numa razão de, e. g., 4/2/1 (v/v/v), para produzir um volume final de 50 µL. A placa de ensaio foi incubada durante 2 h, a 37 °C, com agitação orbital (210 rpm), para promover o processo fagocítico. A reação foi parada por colocando a microplaca em gelo durante, pelo menos, 1 min. Foi depois transferida uma alíquota de 20 µL

de cada poço da placa para o poço correspondente de uma microplaca de fundo plano de 96 poços e foram adicionados a cada poço 50 µL de agar de Caldo de Todd-Hewitt 0,9%. Após a incubação, de um dia para o outro, a 37 °C e CO₂ 5%, as colónias pneumocócicas que apareceram no agar foram contadas utilizando um sistema de análise de imagem automatizada (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Foram utilizados como controlos bacterianos oito poços sem amostra de soro, para determinar o número de pneumococos por poço. O número médio de CFU dos poços de controlo foi determinado e utilizado para o cálculo da atividade de morte para cada amostra de soro. O título de OPA para as amostras de soro foi determinado pela diluição recíproca de soro capaz de facilitar a morte de 50% dos pneumococos. O título opsonofagocítico foi calculado utilizando uma análise de ajuste de curva de 4 parâmetros.

A tabela 3 descreve os níveis de GMC obtidos por imunização de murganhos balb/c com os conjugados preparados utilizando os métodos do exemplo 4.

Tabela 3

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Indivíduo/ Resultado	PS06B- CRM122 (R:1/1, PS 84 kDa)	PS06B- CRM123 (R:3/1, PS 84 kDa)	PS06B- CRM124 (R:1,5/1, PS 350 kDa)	PS06B- CRM125 (R:2,9/1, PS 350 kDa)	PS06B- CRM003 (CDAP)	PS06B-PD
GMC (UG-ML)	0,83	0,37	1,18	0,54	0,31	0,10
Respon- dentes (%)	31/40	26/40	33/40	29/40	29/40	15/40

A imunogenicidade destes conjugados em murganhos balb/c está descrita na figura 3. Em conjunto, a figura 3 e a tabela 3 demonstram que, no modelo de murganho, os conjugados produzidos por aminação redutora foram comparáveis com aqueles produzidos utilizando química de CDAP. Em particular, a figura 3 demonstra que as imunogenicidades dos conjugados produzidos utilizando a aminação redutora foram mais elevadas do que a imunogenicidade do conjugado preparado utilizando a química de CDAP.

A tabela 4 descreve os níveis de GMC obtidos por imunização de cobaias com os conjugados preparados utilizando os métodos do exemplo 4.

Tabela 4

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Indivíduo/ Resultado	PS06B- CRM122 (R:1/1, PS 84 kDa)	PS06B- CRM123 (R:3/1, PS 84 kDa)	PS06B- CRM124 (R:1,5/1, PS 350 kDa)	PS06B- CRM125 (R:2,9/1, PS 350 kDa)	PS06B- CRM003 (CDAP)	PS06B-PD
GMC (UG-ML)	3,51	7,70	2,84	19,93	3,70	1,55
Respon- dentes (%)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20

A imunogenicidade destes conjugados em cobaias está descrita na figura 4. De modo semelhante às experiências realizadas no modelo de murganho, os resultados na tabela 4 e figura 4 mostram que os conjugados produzidos por aminação redutora foram comparáveis com aqueles produzidos utilizando química de CDAP, em particular, o PS06B-CRM125 demonstrou níveis

de GMC e imunogenicidades significativamente mais elevados do que o conjugado produzido utilizando CDAP.

Exemplo 7 - Conjugação de Hib a toxoide tetânico utilizando aminação redutora

Hib-IO4-LS080

Foram dissolvidos 2,9 g de PS (dosagem de orcinol, lote AHIBCPA007) em 260 mL de tampão fosfato 10 mM (Na/K₂), pH 6,2, durante 4 h e 30 min à temperatura ambiente e, depois, de um dia para o outro a +4 °C. O seguimento da viscosidade foi realizado durante a dissolução. Após 4 horas, a dissolução da viscosidade pareceu ser estável. O PS foi diluído a 10 mg/mL com tampão fosfato e depois oxidado no escuro com 0,07 equivalentes molares de NaIO₄, durante 60 minutos. O PS oxidado foi diafiltrado (Sartorius Hydrosart 2 kDa) contra 3,5 volumes de tampão fosfato e depois filtrados sobre um filtro de 0,22 µm. O número de unidades de repetição obtidas após oxidação foi estimado por RMN de ¹H e verificou-se ser cerca de 21.

Hib-TT-LS210, 212 e 213

Foram misturados 200 mg de PS oxidado (14,56 mg/mL) com 300 mg de TT (31,18 mg/mL, razão TT/PS (p/p): 1,5/1) e diluídos para 4 mg/mL com 36,64 mL de tampão fosfato 10 mM (Na/K₂) pH 6,2. A solução foi liofilizada na presença de um agente de estabilização. Os PS + TT liofilizados foram solubilizados com 20 mL de DMSO durante 6 h, a 25 °C. Depois, foram adicionados 10 Meq de TAB (triacetoxiboro-hidreto de sódio) (38,7 mg) e,

após 16 h sob agitação, foram adicionados 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/mL em NaOH 0,1 M) seguido por uma incubação durante 30 min à temperatura ambiente. A solução foi diluída 3x por adição de WFI, seguido por um passo de diafiltração (5 volumes de WFI seguido por 5 volumes de tampão acetato 10 mM NaCl 150 mM pH 6,2, 100 kDa MWCO). A amostra foi depois carregada numa resina Sephacryl S300HR. A eluição foi realizada em tampão acetato 10 mM utilizando NaCl 150 mM (pH 6,2). As frações interessantes foram agrupadas e filtradas sobre um filtro de 0,22 μm . Os conjugados resultantes tiveram uma razão TT/PS final (p/p) de 2,1/1.

Lisboa, 28 de agosto de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a conjugação de um sacárido bacteriano compreendendo os passos de

- a) fazer reagir o sacárido bacteriano com 0,001-0,7 equivalentes molares de periodato para formar um sacárido bacteriano ativado;
- b) misturar o sacárido bacteriano ativado com uma proteína transportadora;
- c) fazer reagir o sacárido bacteriano ativado e a proteína transportadora com um agente redutor para formar um conjugado;

ou

- a) fazer reagir o sacárido bacteriano com 0,001-0,7 equivalentes molares de periodato para formar um sacárido bacteriano ativado;
- b) misturar o sacárido bacteriano ativado com um ligante;
- c') fazer reagir o sacárido bacteriano ativado com o ligante utilizando um agente redutor para formar um ligante de sacárido bacteriano;
- d) fazer reagir o ligante de sacárido bacteriano com uma proteína transportadora para formar um conjugado;

em que o passo a) ocorre num tampão que não contém um grupo amina e o tampão tem uma concentração entre 1 - 100 mM e em que o sacárido bacteriano é o sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6B.

2. Processo da reivindicação 1 em que o tampão é selecionado do grupo consistindo de tampão fosfato, tampão borato, tampão acetato, tampão carbonato e tampão citrato, opcionalmente em que o tampão tem uma concentração entre 1-50 mM, 1-25 mM, 1-10 mM, 5-15 mM, 8-12 mM ou 10-50 mM ou cerca de 10 mM.
3. Processo de qualquer uma das reivindicações 1-2, em que o pH no passo a) é pH 3,5-8,0, 5,0-7,0 ou pH 5,5-6,5 ou cerca de pH 6,0.
4. Processo de qualquer uma das reivindicações 1-3, em que o peso molecular médio do sacárido bacteriano é entre 1-1100 kDa, 100-470 kDa, 200-300 kDa, 600-1100 kDa ou 800-1000 kDa após o passo a).
5. Processo de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que a proteína transportadora é selecionada do grupo consistindo de toxoide tetânico, fragmento C de toxoide tetânico, toxoide diftérico, CRM197, Pneumolisina, proteína D, PhtD, PhtDE e N19.
6. Processo de qualquer uma das reivindicações 1-5, em que o agente redutor compreende cianoboro-hidreto de sódio ou triacetoxiboro-hidreto de sódio.
7. Processo de qualquer uma das reivindicações 1-6 compreendendo um passo e) adicional de purificação do conjugado.

8. Processo de qualquer uma das reivindicações 1-7 contendo um passo adicional de mistura do conjugado com antígenos adicionais, opcionalmente em que os antígenos adicionais compreendem, pelo menos, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 sacáridos de *S. pneumoniae* selecionados do grupo consistindo de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F.
9. Processo da reivindicação 8, em que os antígenos adicionais compreendem uma ou mais proteínas de *S. pneumoniae* selecionadas do grupo consistindo da família da Tríade de Poli-histidina (PhtX), família das Proteínas de Ligação a Colina (CbpX), truncados de CbpX, família de LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas do truncado de CbpX - truncado de LytX (ou fusões), pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 e Sp133.
10. Processo de qualquer uma das reivindicações 1-9, em que o conjugado é misturado com um adjuvante ou um excipiente farmacologicamente aceitável.

Lisboa, 28 de agosto de 2015

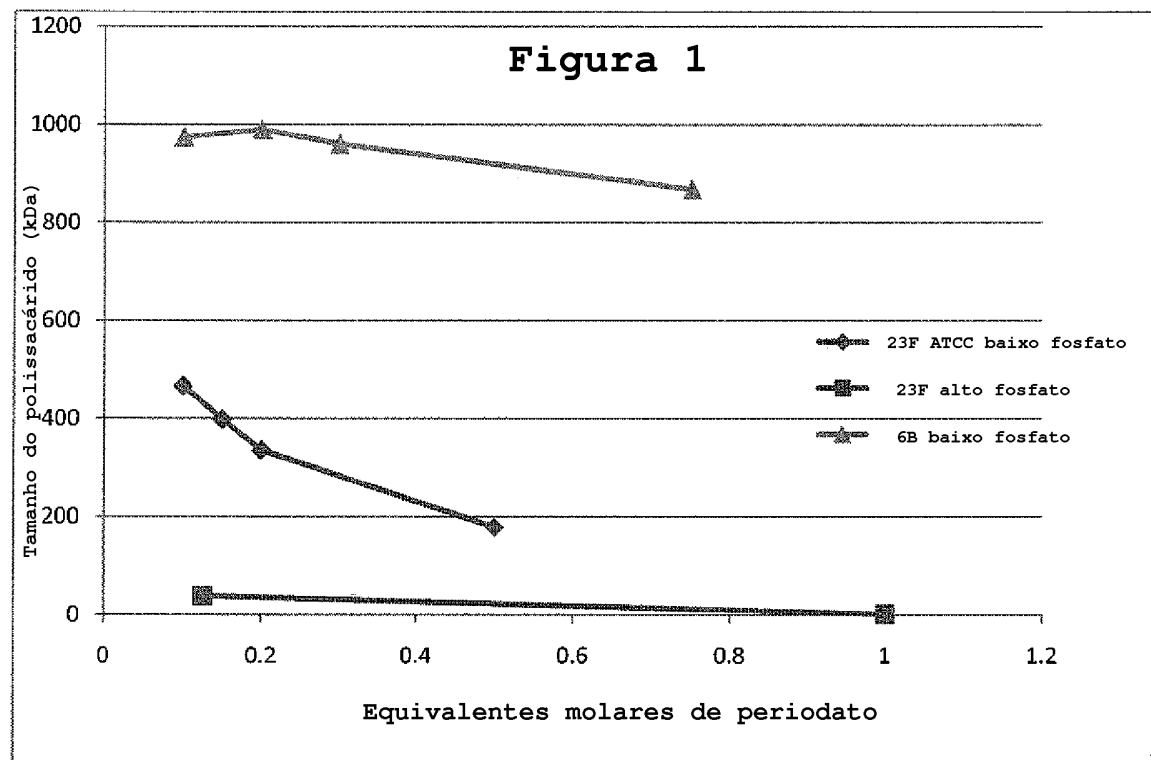
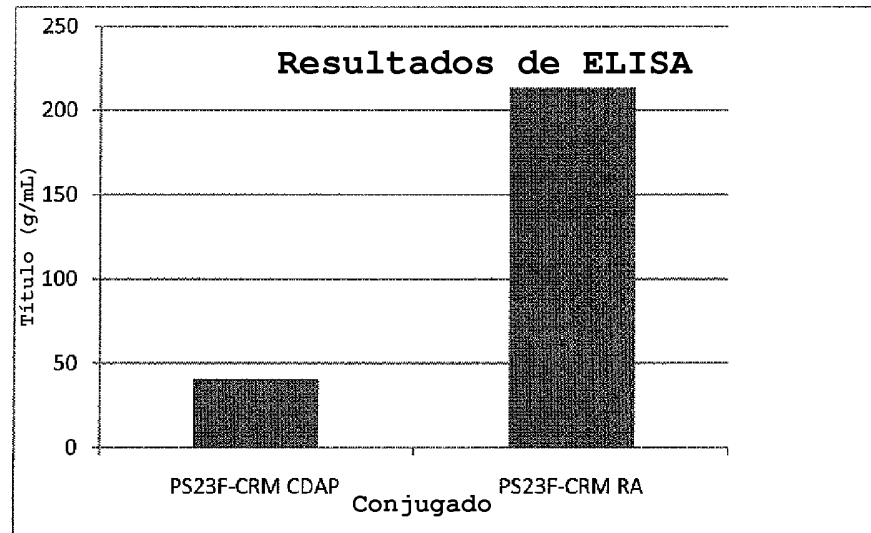


Figura 2

a)



b)

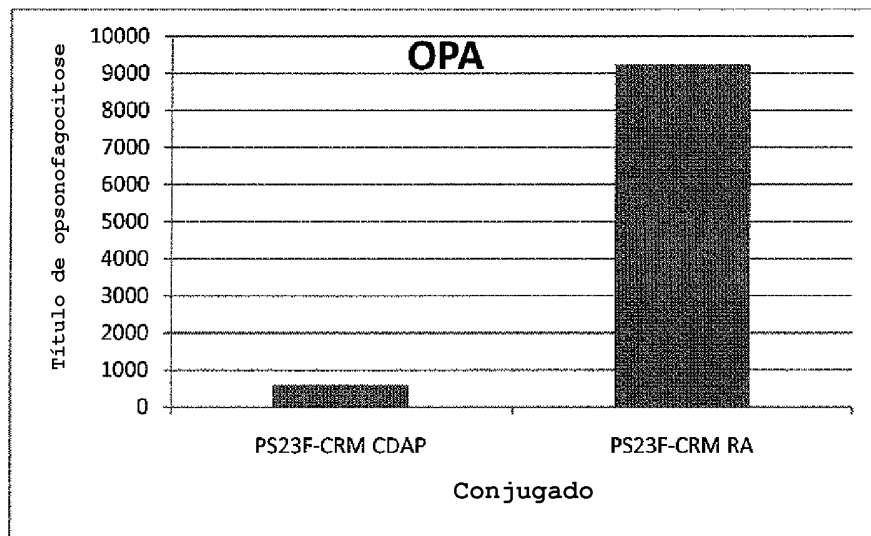


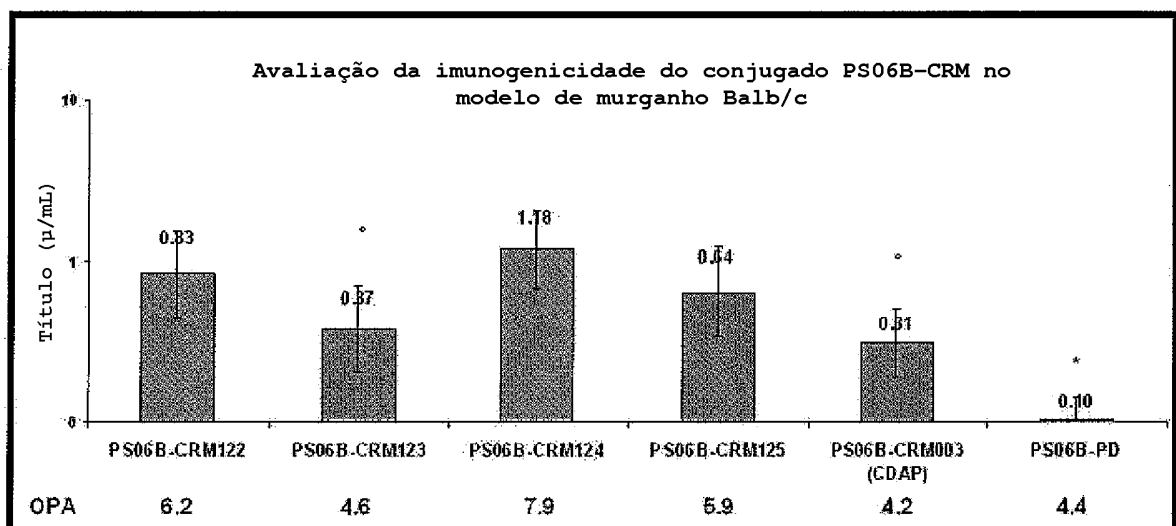
Figura 3

Figura 4