



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

(11) PI 0708849-3 B1



(22) Data do Depósito: 16/03/2007

(45) Data de Concessão: 17/05/2022

(54) Título: MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS IMUNOGÊNICOS MULTIVALENTES COMPLEXOS, OS REFERIDOS CONJUGADOS, E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

(51) Int.Cl.: A61K 39/385; A61K 39/08; A61K 39/095.

(30) Prioridade Unionista: 17/03/2006 US 60/783,490.

(73) Titular(es): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.

(72) Inventor(es): CHE-HUNG ROBERT LEE.

(86) Pedido PCT: PCT US2007006627 de 16/03/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/109129 de 27/09/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/09/2008

(57) Resumo: MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS IMUNOGÊNICOS MULTIVALENTES COMPLEXOS OS REFERIDOS CONJUGADOS, E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS. A presente invenção refere-se a métodos para a preparação de conjugados imunogênicos multivalentes complexos que incluem a reação simultânea de diversos polissacarídeos imunogênicos distintos com pelo menos uma proteína para a produção dos conjugados imunogênicos multivalentes complexos. A reação simultânea envolve a reação de um grupo hidrazida em um reagente com um grupo éster de aldeído ou cianato no outro reagente.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS IMUNOGÊNICOS MULTIVALENTES COMPLEXOS, OS REFERIDOS CONJUGADOS, E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS"**.

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos métodos para a produção de conjugados imunogênicos multivalentes, e aos conjugados feitos por tais métodos.

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido U.S. Provisório N° 60/783.490, depositado em 17 de março de 2006, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido de patente está relacionado com o WO 2005/014037, depositado em 6 de agosto de 2004, e WO 2005/037320, depositado em 6 de agosto de 2004, ambos aqui incorporados por referência em suas totalidades.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Polissacarídeos bacterianos (PSs) são antígenos T-independentes que induzem imunidade de curto prazo em crianças mais velhas e em adultos, mas freqüentemente não em crianças mais jovens. PSs são incapazes de se ligar às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal, o que é necessário para a apresentação de antígeno e estimulação de linfócitos T auxiliares. PSs são capazes de estimular linfócitos B para a produção de anticorpos sem o auxílio de linfócitos T auxiliares. Em consequência da estimulação T-independente dos linfócitos B, há uma ausência de memória de indução após imunização por esses antígenos.

Antígenos polissacarídicos T-independentes podem ser convertidos em antígenos T-dependentes por adesão covalente dos polissacarídeos às moléculas de proteína. Células B que se ligam ao componente polissacarídico da vacina conjugada podem ser ativadas por células T auxiliares específicas para peptídeos que são parte da proteína veículo conjugada. A resposta de células T auxiliares à proteína veículo serve para aumentar a

produção de anticorpos ao polissacarídeo. Vacinas conjugadas-PS são híbridos de polissacarídeo-proteína formados pela adesão covalente de uma proteína a um PS. A modificação química do PS antes da adesão é tipicamente necessária, pois a maioria dos PSs bacterianos nativos não pode ser ligada quimicamente a uma proteína sem primeiro passar por alguma modificação química ("ativação").

A adesão à proteína faz com que os PSs tenham acesso à propriedade imunológica de diversos epitopos de células T da proteína. Esses epitopos de células T interagem com células T auxiliares CD4, facilitando enormemente uma resposta de anticorpo ao polissacarídeo anexado. A resposta dependente de célula T auxiliar a um conjugado resulta tanto em anticorpos séricos IgG quanto em memória imunológica, até mesmo em crianças pequenas, por exemplo, crianças abaixo de dois anos de idade. Adicionalmente, a imunogenicidade do PS-conjugado, em contraste com o PS nativo, é menos dependente do tamanho do PS conjugado. Conseqüentemente, conjugados preparados com PS ou oligossacarídeos podem ter imunogenicidade similar.

Há muitas reações de conjugação que foram empregadas para a ligação de forma covalente de polissacarídeos a proteínas. Três desses métodos mais comumente empregados incluem: 1) aminação redutiva, em que o grupo aldeído ou cetona em um componente da reação reage com o grupo amino ou hidrazida no outro componente, e a ligação dupla C=N formada é subseqüentemente reduzida a uma ligação simples C-N por um agente redutor; 2) conjugação por cianilação, em que o polissacarídeo é ativado por brometo de cianogênios (CNBr) ou por tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamonio piridínio (CDAP) para a introdução de um grupo cianato ao grupo hidroxila, que forma uma ligação covalente com o grupo amino ou hidrazida mediante a adição do componente protéico; e 3) uma reação de carbodiimida, em que a carbodiimida ativa o grupo carboxila em um componente da reação de conjugação, e o grupo carbonila ativado reage com o grupo amino ou hidrazida no outro componente. Essas reações também são freqüentemente empregadas para ativar os componentes do conjugado, antes da rea-

ção de conjugação.

As vacinas conjugadas de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) representam as primeiras vacinas conjugadas de PS-proteína produzidas para uso clínico. Robbins e outros em 1980 utilizaram o processo biotecnológico de anexação química de sacarídeos de Hib aos veículos protéicos, um conceito desenvolvido 50 anos antes. Vide Avery *et al.*, *J. Exp. Med.* 1929; 50: 533-SSO; Schneerson *et al.*, *J. Exp. Med.* 1980; 152: 361-376. Há agora quatro vacinas conjugadas de Hib diferentes licenciadas nos Estados Unidos, cada uma diferente e cada uma possuindo suas próprias características físicas, químicas e imunológicas, como resumido na Tabela A. Foi publicada uma revisão detalhada da química de conjugação e do controle de qualidade usados nessas vacinas. Vide Kniskern *et al.*, "(Conjugation: design, chemistry, and analysis" em Ellis *et al.*, "Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines". Nova York: Marcel Dekker, 1994: 37-69.

15 Tabela A

Vacina*	Tamanho do sacarídeo	Proteína veículo	Espaçador (vinculador)
PRP-D (Connaught)	Polissacarídeo	Toxóide diftérico	Espaçador de 6 carbonos (ADH)
HbOC (Wyeth-Dederle)	Oligossacarídeo	Proteína diftérica (CRM)	Nenhum (amida)
PRP-OMPC (Merck)	Pequeno polissacarídeo	Proteína meningocócica	Tioéter (bigenérica)
PRP-T (Aventis Pasteur)	Polissacarídeo	Toxóide tetânico	Espaçador de 6 carbonos (ADH)

O primeiro conjugado de Hib comercial, conjugado de fosfato de polirribosilribitol - toxóide diftérico (PRP-D), consiste em PS de Hib com tamanho parcialmente reduzido anexado por meio de um espaçador de seis carbonos, diidrazida de ácido adípico (ADH), ao toxóide diftérico com o uso do o procedimento de Schneerson *et al.*, *J. Exp. Med.* 1980; 152: 361-376. O derivado de ADH do toxóide diftérico foi obtido nesse método por reação com ADH na presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC). O PS de Hib foi então ativado por criação de grupos ciana-

to nos grupos hidroxila com o uso de CNBr. O PS ativado foi conjugado ao ADH-toxóide (conjugação por cianilação), mas o processo criou uma ligação instável, e o conjugado tinha solubilidade problemas.

A química de conjugação de Robbins foi posteriormente modificada de forma que o espaçador de ADH é adicionado primeiro ao polissacarídeo, que é então conjugado à proteína purificada na presença de EDC (reação de carbodiimida). Vide Chu *et al.*, *Infect. Immun.* 1983; 40: 245-256; Schneerson *et al.* *Infect. Immun.* 1986, 52: 519-528. Essa modificação aumentou a eficiência da conjugação e a solubilidade do produto. A vacina conjugada de fosfato de polirribosilribitol - proteína tetânica (PRP-T) utiliza a química aperfeiçoada para ligar de forma covalente o polissacarídeo de Hib ao toxóide tetânico (vide Tabela 1).

A vacina de conjugado de toxóide diftérico mutante com reação cruzada com fosfato de polirribosilribitol (PRP-CRM), também denominado conjugado de oligossacarídeo de *Haemophilus b* (HbOC), não contém PS de Hib. Em vez disso, ela utiliza oligossacarídeos de cerca de 20 unidades de repetição derivados por oxidação com periodato da funcionalidade glicol na porção ribitol. Os oligossacarídeos oxidados são então anexados diretamente à CRM₁₉₇, uma forma mutante atóxica de toxina diftérica na presença de cianoboroidreto de sódio (aminação redutiva). Vide Anderson *et al.*, *J. Immunol.* 1989; 142: 2.464-8; e Anderson, *Infect. Immun.* 1983, 39: 233-238. Nesse método de conjugação, verificou-se que a proporção de oligossacarídeo para proteína era crítica para a resposta de anticorpo ótima. Vide Kniskern *et al.*, "Conjugation: design, chemistry, and analysis" em Ellis *et al.*, "Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines". Nova York: Marcel Dekker, 1994: 37-69; Anderson *et al.*, *J. Immunol.* 1989; 142: 2.464-8.

Comparadas com outras vacinas conjugadas de Hib, a vacina conjugada de polissacarídeo de Hib-complexo de proteínas da membrana externa de *Neisseria meningitidis* (PRP-OMPC) possui várias propriedades únicas. O transportador protéico não é um componente da vacina de difteria, tétano e pertussis (DTP), mas consiste em vesículas da membrana externa

meningocócica com lipopolissacarídeos removidos às quais são anexados PS de Hib com tamanho reduzido por meio de uma ligação tioéter. Vide Marburg *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 1986; 108: 5.282-5287; Kniskern *et al.*, "Conjugation: design, chemistry, and analysis" em Ellis *et al.*, "Development and clinical uses of Haemophilus b conjugate vaccines". Nova York: Marcel Dekker, 1994: 37-69; Anderson *et al.*, *J. Immunol.* 1989; 142: 2.464-8. Nesse processo, vinculadores separados são anexados tanto à proteína quanto ao polissacarídeo de Hib, seguido por fusão dos vinculadores, para formar uma ligação tioéter.

10 *Neisseria meningitidis* é uma causa importante de meningite e sépsis bacterianas em todo o mundo. Meningococos patogênicos são envelopados por uma cápsula de polissacarídeo que é anexada à superfície da membrana externa do organismo. Treze sorogrupos diferentes de meningococos foram identificados com base na especificidade imunológica do polissacarídeo capsular (Frasch, C. E., *et al.* 1985). Desses treze sorogrupos, 15 cinco causam a maioria das doenças meningocócicas; esses incluem os sorogrupos A, B, C, W135 e Y. O sorogrupo A é responsável pela maior parte das doenças epidêmicas. Os sorogrupos B, C e Y causam a maior parte das doenças endêmicas e de surtos localizados. As defesas do hospedeiro contra meningococos invasivos dependem da bacteriólise mediada por complemento. Os anticorpos séricos que são responsáveis pela bacteriólise mediada por complemento são dirigidos, em grande parte, contra o polissacarídeo capsular externo. 20

As vacinas convencionais baseadas no polissacarídeo meningocócico despertam uma resposta imunológica contra o polissacarídeo capsular. Esses anticorpos são capazes de bacteriólise mediada por complemento dos meningococos sorogrupo específicos. As vacinas de polissacarídeo meningocócico demonstraram ser eficazes em crianças e adultos. No entanto, a eficácia era limitada em crianças pequenas e crianças jovens, e as doses 25 subseqüentes do polissacarídeo em populações mais jovens despertaram uma resposta de reforço fraca ou ausente. 30

Foram empregadas diversas abordagens para ativação do PS

- meningocócico e para conjugação, como resumido na Tabela B. Cada modo de ativação possui o potencial para alterar epitopos importantes, até mesmo quando relativamente poucos sítios são ativados na molécula de PS. A ativação com periodato do PS meningocócico do grupo C, por exemplo, produz
- 5 a quebra da cadeia, com a geração de unidades de sacarídeos menores com grupos aldeído terminais que podem ser ligadas à proteína por meio de aminação redutiva. Richmond *et al.*, *J. Infect. Dis.* 1999; 179: 1.569-72.

Tabela B

Método	Tamanho do sacarídeo	Proteína veículo	Espaçador	Procedimento	Usada em seres humanos
Nº 1 Aminação redutiva	Reduzido	Toxóide tetânico	Nenhum	Forma de aldeído de PS combinada com proteína na presença de ciano-boroidreto de sódio	Não
Nº 2 Carbodiimida	Nativo	Toxóide tetânico	Nenhum	PS e proteína combinados na presença de carbodiimida, e depois bloqueados com etanolamina	Não
Nº 3 Éster ativo ^a	Oligosacarídeo	CRM ₁₉₇	Ácido adípico	Terminal redutivo aminado do oligosacarídeo conjugado à proteína por ácido adípico (NHS) ₂	Sim
Nº 4 Aminação redutiva	Reduzido	CRM ₁₉₇	Nenhum	Forma de aldeído de PS combinada com proteína na presença de ciano-boroidreto de sódio	Sim

Método	Tamanho do sacarídeo	Proteína veículo	Espaçador	Procedimento	Usada em seres humanos
Nº 5 Aminação redutiva	De-OAc-PS ^b	Toxóide tetânico	Nenhum	Forma de aldeído de PS combinado com proteína na presença de ciano-boroidreto de sódio	Sim

a. Diéster de hidroxisuccinimida de ácido adípico

b. PS de deacetilato só relatado para grupo meningocócico C

Estudos iniciais sobre a produção e otimização de conjugados meningocócicos do grupo C foram relatados bem antes da comercialização dos conjugados de Hib. Vide Beuvery *et al.*, *Infect. Immun.* 1982; 37: 15-22; Beuvery *et al.*, *Infect. Immun.* 1983; 40: 39-45; Beuvery *et al.*, *J. Infect.* 1983; 6: 247-55; Jennings, *et al.*, *J. Immunol.* 1981; 127: 1.011-8.

Duas metodologias diferentes de conjugação foram relatadas para ligação química do PS do grupo C a um transportador protéico. Vide Jennings *et al.*, *J. Immunol.* 1981; 127:1011-8; Beuvery *et al.*, *Infect. Immun.* 1983; 40: 39-45. A primeira abordagem emprega PS despolimerizado parcialmente, que é ativado por criação de grupos aldeído terminais por meio da oxidação com periodato (Método Nº 1 na Tabela 2). Os aldeídos são então reagidos por meio de aminação redutiva com grupos amino livres na proteína, principalmente lisinas, na presença de cianoboroidreto de sódio. Vide Jennings *et al.*, *J. Immunol.* 1981; 127: 1.011-8. Nesse método, a ativação ocorre em um sítio específico de des-O-acetilação no PS do grupo C.

A segunda abordagem utiliza a reação de carbodiimida (Método Nº 2 na Tabela 2) para ligar de forma covalente grupos carboxílicos no PS de alto peso molecular aos grupos ϵ -amino de lisina na proteína veículo. Os sítios de ativação nesse método são mais aleatórios, comparado com a ativação com periodato.

Os conjugados meningocócicos do grupo C preparados por esses dois métodos foram avaliados em animais. Vide Beuvery *et al.*, *Dev. Biol. Stand.* 1986; 65: 197-204; e Beuvery *et al.*, *J. Infect.* 1983; 6:247-55. Os

conjugados estimularam respostas tanto células T-independentes quanto células T-dependentes com a imunização inicial. Vide Beuvery *et al.*, *J. Infect.* 1983; 6: 247-55. Estudos demonstraram que o PS deve, no entanto, estar ligado de forma covalente à proteína veículo para induzir uma resposta de anticorpos de célula T-dependente.

Os primeiros meningocócicos do grupo A e do grupo C conjugados a serem usados em experimentos clínicos foram preparados por Chiron Vaccines e foram relatados em 1992 (Método Nº 3 na Tabela 2). Vide Costantino *et al.*, *Vaccine* 1992; 10: 691- 8. O método de conjugação era baseado na ativação seletiva do grupo terminal de pequenos oligossacarídeos produzido por hidrólise de ácido leve, seguida por acoplamento a uma proteína por meio de um espaçador de hidrocarboneto. O mutante atóxico da toxina diftérica, CRM, foi usado como o transportador protéico. Para ativar os oligossacarídeos para conjugação, um grupo amino era adicionado à extremidade do oligossacarídeo, e depois reagido com o N-hidroxissuccinimida diéster de ácido adípico para criar um éster ativo. Esse éster ativo foi então ligado de forma covalente aos grupos ϵ -amino de lisina na proteína CRM₁₉₇, criando o conjugado.

Métodos convencionais para a preparação de vacinas conjugadas de PS-proteína não utilizam química de hidrazida na reação de conjugação de aminação redutiva, muito embora hidrazida na forma de ADH tenha sido usada na ativação do polissacarídeo. Esses métodos de técnicas estabelecidas utilizam grupos ϵ -amino de resíduos de lisina na proteína para reação com grupos funcionais em PSs ativados, por exemplo, grupos aldeído (aminação redutiva) e grupos carboxila. A eficiência da reação é baixa, tipicamente apenas cerca de 20%. A reação também requer dois a três dias para que a conjugação esteja completada, necessitando do uso de etapas de purificação para separar o conjugado do PS não-reagido. Vide Guo *et al.* "Protein-polysaccharide conjugation" em: Pollard *et al.*, "Methods in Molecular Medicine", Vol. 66: "Meningococcal Vaccines: methods and Protocols", Humana Press, Totowa, NJ, 2001, pg 49-54. Há diversas explicações que foram propostas para os baixos rendimentos observados. Primeiro, o grupo

£-amino de lisina ($pK_a = 10,5$) possui baixa reatividade nas condições de conjugação ($pH\ 6,5-7,4$). Vide Inman *et al.*, *Biochemistry* 1969; 8: 4074-4.082. Em segundo lugar, a maioria dos métodos de conjugação emprega toxóides como as proteínas veículo. Os toxóides são derivados de toxinas por detoxificação com formaldeído, que se combina com os grupos amino das toxinas, deixando um número limitado de grupos amino disponível para a conjugação. Em terceiro lugar, a solubilidade reduzida da proteína ativada e do conjugado proteína-PS resultantes pode levar à precipitação.

Conseqüentemente, são desejados métodos para síntese e fabricação de vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína em altos rendimentos. Também são desejáveis métodos nos quais a reação evolua em uma taxa rápida, com produção reduzida de subprodutos indesejados, e com quantidades reduzidas de proteína e polissacarídeo não-reagidos permanecendo ao final da reação.

As vacinas baseadas em PSs existentes são de uso limitado em crianças jovens e não fornecem proteção duradoura em adultos. Dessa forma, existe a necessidade de uma vacina conjugada de proteína-PS capaz de conferir proteção de longo prazo contra doenças em crianças e adultos em risco para o desenvolvimento de, por exemplo, meningite bacteriana, pneumonia, tétano e outras infecções bacterianas. Os conjugados proteína-PS da modalidade preferida podem ser empregados para a preparação de formulações de vacina capazes de conferir proteção de longo prazo às crianças pequenas, crianças e adultos.

A administração de vacinas multivalentes (ou combinadas), que contêm vacinas múltiplas, se tornou mais prevalecente recentemente em função das vantagens econômicas e logísticas, além de uma melhor aceitação do paciente na aplicação no campo. Tendências similares estão ocorrendo para as vacinas conjugadas. Exemplos típicos desse tipo de vacina conjugada combinada são Prevnar (Wyeth Lederle), a vacina pneumocócica conjugada heptavalente, e Menactra (Aventis Pasteur), a vacina conjugada meningocócica tetravalente.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São aqui descritos métodos para a produção de conjugados imunogênicos multivalentes complexos, incluindo vacinas conjugadas.

Em uma modalidade, é descrito um método para a produção de
5 um conjugado imunogênico multivalente complexo, que compreende:

- reação de diversos polissacarídeos imunogênicos distintos com um agente oxidante, resultando em uma mistura de diversos polissacarídeos imunogênicos distintos ativados por aldeído;

- reação de pelo menos uma proteína com hidrazina, carboidra-
10 zida, cloreto de hidrazina, uma diidrazida, ou uma mistura destas, sob condições suficientes para produzir uma solução de pelo menos uma proteína ativada por hidrazida;

- contato da mistura dos diversos polissacarídeos imunogênicos distintos ativados por aldeído com pelo menos uma proteína ativada por hidrazida em um pH de cerca de 5 a cerca de 8, de tal forma que os diversos polissacarídeos imunogênicos ativados por aldeído distintos simultaneamente reajam com pelo menos uma proteína ativada por hidrazida, resultando em um conjugado multivalente complexo que inclui pelo menos uma ligação dupla C=N formada entre cada polissacarídeo imunogênico distinto anexado
15 e a proteína; e

- redução de substancialmente todas as ligações duplas C=N do conjugado multivalente complexo em ligações C-N, resultando em um produto conjugado imunogênico multivalente complexo.

Em uma modalidade adicional, é descrito um método para a
25 produção de um conjugado imunogênico multivalente complexo, que compreende:

- reação de diversos polissacarídeos imunogênicos distintos com um agente de cianilação, resultando em uma mistura de diversos polissacarídeos imunogênicos ativados por cianato distintos;

- reação de pelo menos uma proteína com hidrazina, carboidra-
30 zida, dicloreto de hidrazina, uma diidrazida, ou uma mistura destas, sob condições suficientes para produzir uma solução de pelo menos uma proteína

ativada por hidrazida; e

- contato da mistura dos diversos polissacarídeos imunogênicos ativados por cianato distintos com pelo menos uma proteína ativada por hidrazida em um pH de cerca de 6 a cerca de 8, de tal forma que os diversos polissacarídeos imunogênicos ativados por cianato distintos simultaneamente reajam com pelo menos uma proteína ativada por hidrazida, resultando em um conjugado imunogênico multivalente complexo que inclui pelo menos uma ligação C-N formada entre cada polissacarídeo imunogênico distinto anexado e a proteína.

Em outra modalidade, é descrito um método para a produção de um conjugado imunogênico multivalente complexo, que compreende:

- reação de uma proteína com 1-amino-2,3-propanodiol (ADPO) na presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida em um pH de cerca de 6 a cerca de 7, resultando em uma solução de uma proteína modificada por ADPO;

- reação da proteína modificada por ADPO com um agente oxidante, resultando em uma solução de uma proteína ativada por aldeído;

- contato de uma mistura dos diversos polissacarídeos imunogênicos ativados por hidrazida distintos com a proteína ativada por aldeído em um pH de cerca de 5 a cerca de 8, de tal forma que os diversos polissacarídeos imunogênicos ativados por hidrazida distintos simultaneamente reajam com pelo menos uma proteína ativada por aldeído, resultando em um conjugado multivalente complexo que inclui pelo menos uma ligação dupla C=N formada entre cada polissacarídeo imunogênico distinto anexado e a proteína; e

- redução de substancialmente todas as ligações duplas C=N do conjugado multivalente complexo em ligações C-N, resultando em um produto conjugado imunogênico multivalente complexo.

Também são aqui descritos métodos para a preparação de uma proteína ativada por hidrazida, que compreendem:

- reação de uma proteína com hidrazina, carboidrazida, cloreto de hidrazina, uma diidrazida, ou uma mistura destas, na presença de: (i)

uma carbodiimida e (ii) pelo menos um aminoácido, pelo menos um peptídeo, ou uma mistura de pelo menos um aminoácido e pelo menos um peptídeo.

Uma modalidade adicional aqui descrita para a produção de um conjugado imunogênico multivalente complexo inclui:

(a) o contato de pelo menos um primeiro polissacarídeo imunogênico ativado por aldeído distinto com pelo menos uma proteína ativada por hidrazida, sob condições suficientes para formar um primeiro intermediário conjugado, de tal forma que se forme pelo menos uma ligação dupla C=N entre o primeiro polissacarídeo imunogênico distinto e a proteína;

(b) o contato de pelo menos um segundo polissacarídeo imunogênico ativado por aldeído distinto com o primeiro intermediário conjugado, de tal forma que se forme pelo menos uma ligação dupla C=N entre o segundo polissacarídeo imunogênico distinto e a proteína; e

(c) redução de substancialmente todas as ligações duplas C=N em ligações C-N, resultando em um produto conjugado imunogênico multivalente complexo (a redução é, de preferência, uma etapa única, de tal forma que todas as ligações duplas C=N sejam substancialmente reduzidas simultaneamente);

em que a reatividade do primeiro polissacarídeo imunogênico ativado por aldeído distinto com a proteína ativada por hidrazida é menor do que a reatividade do segundo polissacarídeo imunogênico ativado por aldeído distinto com a proteína ativada por hidrazida.

Os objetivos, características e vantagens citados anteriormente e outros ficarão mais evidentes a partir da descrição detalhada que será apresentada a seguir, que prossegue com referência às figuras anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 - Perfis de HPLC (280 nm, por uma coluna Superose 6) de produto de ativação de toxóide tetânico (TTH) com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico (ADH), catalisada por várias concentrações de EDC e tempos de reação. As condições de reação são: (A) hidrazina, EDC a 24 mM por 4 horas; (B) hidrazina, EDC a 12 mM, de um dia para o outro; (C) ADH, EDC

a 36 mM por 4 horas; (D) ADH, EDC a 48 mM por 2 horas. O produto possui peso molecular muito alto para passar através da coluna e não mostra sinal de TTH no perfil (A). No perfil (B), somente uma pequena fração do produto passa através da coluna e mostra um pico-sombra para TTH em 34 minutos.

- 5 Nos perfis (C) e (D), o produto passa através da coluna e mostra um pico para TTH em 34 minutos.

Figura 2 - Perfis de HPLC (280 nm, por uma coluna Superose 6) de produto de ativação de toxóide tetânico (TTH) com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico (ADH), catalisada por várias concentrações de EDC na presença de diferentes concentrações de lisina e tempos de reação. As condições de reação são: (A) hidrazina, 24 mM de EDC, 36 mM lisina por 2 horas; (B) hidrazina, EDC a 12 mM, lisina a 144 mM por 2 horas; (C) ADH, EDC a 12 mM, lisina a 36 mM por 1 hora; e (D) ADH, EDC a 12 mM, lisina a 72 mM por 4 horas. Somente uma pequena fração do produto passa através da co-
luna e mostra um pico-sombra em 34 minutos no perfil (A). O produto passa através da coluna e mostra um pico importante em 34 minutos para monô-
mero e um pico menor em 31 minutos para dímero nos perfis (B), (C) e (D).

Figura 3 - Perfis de HPLC (280 nm, por uma coluna Superose 6) de produto de ativação de toxóide tetânico (TTH) com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico (ADH), catalisada por várias concentrações de EDC na presença de ácido glutâmico a 72 mM por vários tempos de reação. As outras condições de reação são: (A) hidrazina, EDC a 24 mM por 1 hora; (B) hidrazina, EDC a 48 mM por 1 hora; (C) ADH, EDC a 24 mM por 1 hora; e (D) ADH, EDC a 48 mM por 2 horas. O produto passes através da coluna e mostra um pico importante em 34 minutos para monômero e um pico menor em 31 minutos para dímero.

Figura 4 - Perfis de HPLC (280 nm, por uma coluna Linear Waters Ultrahidrogel) de (A) toxóide tetânico ativado (TTH) e (B) conjugado multivalente polissacarídeo-toxóide tetânico combinado sintetizado (Conj.) preparado pelo método de conjugação A. Mediante conjugação à mistura de polissacarídeo ativado, o sinal de proteína muda de peso molecular baixo (17,5 minutos) para peso molecular alto (13,5 minutos).

Figura 5 - Detecção por ELISA do componente de polissacarídeo conjugado contido na vacina conjugada multivalente combinada sintetizada (B) na Figura 4. Apenas espécies que contêm proteína (ou seja, conjugados e TTH livre) nas frações de HPLC aderiram à placa de ELISA durante revestimento. Os polissacarídeos conjugados foram subseqüentemente detectados por anti-soros específicos para cada respectivo PS, mas não reagem de forma cruzada com o toxóide tetânico. Foi detectado um pico importante em 12-15 minutos superpondo o sinal de proteína de (B) na Figura 4 para todos os quatro polissacarídeos.

Figura 6 - Perfis de HPLC (280 nm, por uma coluna Linear Waters Ultrahidrogel) de (A) toxóide tetânico ativado (TTH) e (B) conjugado multivalente polissacarídeo-toxóide tetânico combinado sintetizado (Conj.) preparado pelo método de conjugação B. Mediante conjugação à mistura de polissacarídeo ativado, o sinal de proteína muda de peso molecular baixo (17,5 minutos) para peso molecular alto (13,5 minutos). Havia algum TTH livre não-conjugado restante na mistura de produto.

Figura 7 - Detecção por ELISA do componente de polissacarídeo conjugado na vacina conjugada multivalente combinada sintetizada de (B) na Figura 6. Apenas espécies que contêm proteína (ou seja, conjugados e TTH livre) das frações de HPLC aderiram à placa de ELISA durante revestimento, e os polissacarídeos conjugados foram subseqüentemente detectados por anti-soros específicos para cada respectivo PS, mas eles não reagem de forma cruzada com o toxóide tetânico. Foi detectado um pico importante em 12-15 minutos superpondo o sinal de proteína de (B) na Figura 6 para todos os quatro polissacarídeos.

Figura 8 - Perfis de HPLC (280 nm, por uma coluna Linear Waters Ultrahidrogel) de (A) toxóide tetânico ativado (TTH) e (B) conjugado multivalente polissacarídeo-toxóide tetânico combinado sintetizado (Conj.) preparado pelo método de conjugação C. Mediante conjugação à mistura de polissacarídeo ativado, o sinal de proteína muda de peso molecular baixo (17,5 minutos) para peso molecular alto (13,5 minutos). Havia algum TTH livre não-conjugado restante na mistura de produto.

Figura 9 - Detecção por ELISA do componente de polissacarídeo conjugado na vacina conjugada multivalente combinada sintetizada de (B) na Figura 8. Apenas espécies que contêm proteína (ou seja, conjugados e TTH livre) das frações de HPLC aderiram à placa de ELISA durante revestimento, e os polissacarídeos conjugados foram subsequente-
5 detectados por anti-soros específicos para cada respectivo PS, mas eles não reagem de forma cruzada com o toxóide tetânico. Foi detectado um pico importante em 12-15 minutos superpondo o sinal de proteína de (B) na Figura 8 para todos os quatro polissacarídeos.

10 **Figura 10** - Perfis de HPLC (280 nm, por uma coluna Linear Waters Ultrahidrogel) de (A) toxóide tetânico ativado (TTH) e (B) conjugado multivalente polissacarídeo-toxóide tetânico combinado sintetizado (Conj.) preparado pelo método de conjugação A. Mediante conjugação à mistura de polissacarídeo ativado, o sinal de proteína muda de peso molecular baixo
15 (17,5 minutos) para peso molecular alto (13,5 minutos).

Figura 11 - Detecção por ELISA do componente de polissacarídeo conjugado na vacina conjugada multivalente combinada sintetizada de (B) na Figura 10. Apenas espécies que contêm proteína (ou seja, conjugados e TTH livre) das frações de HPLC aderiram à placa de ELISA durante
20 revestimento, e os polissacarídeos conjugados foram subsequente- detectados por anti-soros específicos para cada respectivo PS, mas eles não reagem de forma cruzada com o toxóide tetânico. O sinal de ELISA elevado foi detectado em 12-19 minutos para todos os quatro polissacarídeos. O sinal de ELISA elevado em 12-15 minutos estava superposto ao sinal de pro-
25 teína de (B) na Figura 10, enquanto o sinal de ELISA elevado em 15-19 minutos era causado por conjugados residuais de pequeno peso molecular.

Figura 12 - Perfis de HPLC (280 nm, por uma coluna Linear Waters Ultrahidrogel) de (A) toxóide tetânico ativado (TTH) e (B) conjugado multivalente polissacarídeo-toxóide tetânico combinado sintetizado (Conj.) pre-
30 parado pelo método de conjugação B. Mediante conjugação à mistura de polissacarídeo ativado, o sinal de proteína muda de peso molecular baixo (17,5 minutos) para peso molecular alto (13,5 minutos). Havia TTH livre não-

conjugado substancial restante na mistura de produto.

Figura 13 - Detecção por ELISA do componente de polissacarídeo conjugado na vacina conjugada multivalente combinada sintetizada de (B) na Figura 12. Apenas espécies que contêm proteína (ou seja, conjugados e TTH livre) das frações de HPLC aderiram à placa de ELISA durante revestimento, e os polissacarídeos conjugados foram subsequente-mente detectados por anti-soros específicos para cada respectivo PS, mas eles não reagem de forma cruzada com o toxóide tetânico. O sinal de ELISA elevado foi detectado em 12-18 minutos para todos os quatro polissacarídeos. O sinal de ELISA elevado em 12-15 minutos estava superposto ao sinal de proteína de (B) na Figura 12, enquanto o sinal de ELISA elevado em 15-18 minutos era causado por conjugados residuais de pequeno peso molecular.

Figura 14 - Detecção por ELISA do componente de polissacarídeo conjugado na vacina conjugada multivalente combinada sintetizada do lote TTHACWY061126. Uma amostra de conjugado de 25 µl contendo 0,05 mg/ml de proteína (toxóide tetânico) e 0,0125 mg/ml de cada um de PS de Mn A, C, W135 e Y foi analisada por HPLC. Apenas espécies que contêm proteína (ou seja, conjugados e TTH livre) das frações de HPLC aderiram à placa de ELISA durante revestimento, e os polissacarídeos conjugados foram subsequente-mente detectados por anti-soros específicos para cada respectivo PS, mas eles não reagem de forma cruzada com o toxóide tetânico (símbolos sólidos). A incorporação significativa de PS de Mn A, W135 e Y no conjugado é indicada por seus respectivos sinais de ELISA, quando comparado com o PS de Mn C de sinal de ELISA fraco. Isso foi atribuído à reatividade mais fraca de PS de Mn C ativado na conjugação ao TTH, quando comparado com o PS ativado de Mn A, W135 e Y. Essa observação é consistente com os dados de imunogenicidade do conjugado que mostram uma eficácia menor para Mn C. Uma amostra da mistura de polissacarídeo nativo também foi analisada em paralelo (símbolos abertos). Apenas o PS de Mn A nativo mostra sinal fraco, comparado com o conjugado nessa detecção por ELISA.

Figura 15 - Detecção por ELISA do componente de polissacarí-

deo conjugado na vacina conjugada multivalente combinada sintetizada do lote TTH2C/A/WY070209. Uma amostra de conjugado de 25 µl contendo 0,05 mg/ml de proteína (toxóide tetânico) e 0,0125 mg/ml de cada um de PS de Mn A, C, W135 e Y foi analisada por HPLC. Apenas espécies que contêm

5 proteína (ou seja, conjugados e TTH livre) das frações de HPLC aderiram à placa de ELISA durante revestimento, e os polissacarídeos conjugados foram subsequentemente detectados por anti-soros específicos para cada respectivo PS, mas eles não reagem de forma cruzada com o toxóide tetânico (símbolos sólidos). Uma amostra da mistura de polissacarídeo nativo

10 também foi analisada em paralelo (símbolos abertos). A incorporação significativa de todos os quatro PSs no conjugado é indicada por seus respectivos sinais de ELISA, quando comparados com seus PSs nativos. A reatividade mais fraca do PS de Mn C ativado na conjugação ao TTH mostrada na Figura 14 foi compensada com uma dose mais elevada (dupla, nesse caso) e

15 pela exposição precoce ao TTH, antes da reação com PS ativado de Mn A, W135 e Y.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como aqui usados, os termos no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem seus referentes no plural, a menos que o contexto indique claramente de forma diferente. Da mesma forma, a palavra "ou" visa incluir "e", a menos que o contexto indique claramente de forma diferente. Além disso, como

20 aqui usado, o termo "compreende" significa "inclui". Desse modo, "que compreende A ou B" significa que inclui A, B, ou A e B. Deve-se entender ainda que todos os tamanhos de nucleotídeo ou todos os tamanhos de aminoácido, e todos os valores de peso molecular ou de massa molecular, dados para ácidos nucleicos ou polipeptídeos ou para outros compostos, são aproximados e são fornecidos para fins descritivos. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou testes da presente descrição, métodos e materiais adequados serão

25 descritos abaixo. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos, e não visam ser limitantes. Os métodos e processos aqui descritos não têm seu desempenho limitado em quaisquer seqüências ou etapas

30

específicas, a menos que observado de forma diferente. Por exemplo, a ativação dos polissacarídeos pode ocorrer antes ou depois, ou em paralelo à ativação das proteínas.

A fim de facilitar a revisão dos vários exemplos desta descrição, são fornecidas as seguintes explicações de termos específicos:

"Animal" inclui organismos vertebrados multicelulares vivos, uma categoria que inclui, por exemplo, mamíferos e pássaros. O termo "mamífero" inclui mamíferos tanto humanos quanto não-humanos. Da mesma forma, o termo "indivíduo" inclui indivíduos tanto humanos quanto veterinários, por exemplo, seres humanos, primatas não-humanos, cachorros, gatos, roedores, cavalos e vacas.

Um "antígeno" é um composto, uma composição ou uma substância que podem ser ligados especificamente pelos produtos da imunidade humoral ou celular específica, por exemplo, uma molécula de anticorpo ou um receptor de célula T. Antígenos podem ser qualquer tipo de molécula biológica, incluindo, por exemplo, metabólitos intermediários simples, açúcares (por exemplo, oligossacarídeos), lipídeos e hormônios, além de macromoléculas como, por exemplo, carboidratos complexos (por exemplo, polissacarídeos), fosfolipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Categorias comuns de antígenos incluem, sem limitação, antígenos virais, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoários e outros antígenos parasitários, antígenos tumorais, antígenos envolvidos em doenças auto-imunes, alergia e rejeição de enxertos, toxinas, e outros antígenos diversos.

Um "veículo" é uma molécula imunogênica à qual um hapteno ou um antígeno, por exemplo, um polissacarídeo, pode ser ligado. Quando ligada a um veículo, a molécula ligada pode se tornar mais imunogênica. Veículos são escolhidos para aumentar a imunogenicidade da molécula ligada e/ou para despertar anticorpos contra o veículo que sejam benéficos em termos diagnósticos, analíticos e/ou terapêuticos. A ligação covalente de uma molécula a um veículo confere imunogenicidade aumentada e dependência às células T (Pozsgay *et al.*, PNAS 96: 5.194-97, 1999; Lee *et al.*, *J. Immunol.* 116: 1.711-18, 1976; Dintzis *et al.*, PNAS 73: 3.671-75, 1976). Veí-

culos úteis incluem veículos poliméricos, que podem ser naturais (por exemplo, proteínas de bactérias ou vírus), materiais semi-sintéticos ou sintéticos que contêm um ou mais grupos funcionais aos quais uma porção do reagente pode ser anexada.

- 5 Exemplos de produtos bacterianos para uso como veículos incluem toxinas bacterianas como, por exemplo, PA de *B. anthracis* (incluindo fragmentos que contêm pelo menos um epitopo antigênico e análogos ou derivados capazes de despertar uma resposta imunológica), LF e LeTx, e outras toxinas e toxóides bacterianos, por exemplo, toxina/toxóide tetânico, 10 toxina/toxóide diftérico, exotoxina/toxóide de *P. aeruginosa*, toxina/toxóide de pertussis e exotoxina/toxóide de *C. perfringens*. Proteínas virais, por exemplo, antígeno de superfície e antígeno central do vírus da hepatite B, também podem ser usados como veículos.

- Uma "ligação covalente" é uma ligação interatômica entre dois 15 átomos, caracterizada pelo compartilhamento de um ou mais pares de elétrons pelos átomos. Os termos "ligado de forma covalente" e "unidos de forma covalente" referem-se à transformação de duas moléculas separadas em uma molécula contígua.

- Um "epitopo" é um determinante antigênico. Esses são grupos 20 químicos ou seqüências peptídicas contíguas ou não-contíguas em uma molécula que são antigênicos, ou seja, que despertam uma resposta imunológica específica. Um anticorpo se liga a um epitopo antigênico em particular com base na estrutura tridimensional do anticorpo e no epitopo correspondente (ou cognato).

- 25 "Ligado", "unido", conjugado" ou "anexado" refere-se à união por ligação covalente de um polissacarídeo a uma proteína veículo. A união por ligação covalente pode ser direta ou indireta, por exemplo, ligada por meio de uma molécula espaçadora.

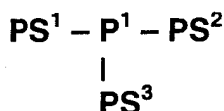
- Um "conjugado imunogênico multivalente complexo" ou "vacina 30 conjugada multivalente complexa" compreende mais de um epitopo antigênico. Em uma primeira modalidade, os conjugados imunogênicos multivalentes complexos aqui descritos incluem misturas de diferentes moléculas, cada

molécula compreendendo diferentes polissacarídeos imunogênicos distintos, em que cada polissacarídeo imunogênico distinto diferente está conjugado a um transportador protéico separado. Em uma segunda modalidade, os conjugados imunogênicos multivalentes complexos aqui descritos incluem moléculas nas quais diversos polissacarídeos imunogênicos distintos estão conjugados a uma única molécula de proteína ou uma única construção de proteína (cuja própria construção de proteína inclui mais de uma proteína diferente). Uma terceira modalidade inclui uma mistura dos conjugados da primeira modalidade e dos conjugados da segunda modalidade. Um exemplo da primeira modalidade pode ser apresentado como uma mistura das diferentes estruturas representadas por:



em que P^1 é uma proteína veículo; e PS^1 , PS^2 e PS^3 são, cada um, polissacarídeos imunogênicos distintos.

Um exemplo da segunda modalidade pode ser descrito como uma estrutura representada por:



em que P^1 é uma proteína veículo; PS^1 , PS^2 e PS^3 são, cada um, polissacarídeos imunogênicos distintos que estão anexados de forma covalente a P^1 .

A proteína e o polissacarídeo nas fórmulas acima podem ser unidades estruturais singulares ou plurais, e há pelo menos uma ligação formada entre a proteína e o polissacarídeo.

Uma "resposta imunológica" é uma resposta de uma célula do sistema imunológico, por exemplo, uma célula B, célula T, macrófago ou polimorfonuclear, a um estímulo. Uma resposta imunológica pode incluir qualquer célula do corpo envolvida em uma resposta de defesa do hospedeiro, por exemplo, uma célula epitelial que secreta interferon ou uma citocina. Uma resposta imunológica inclui, sem limitação, uma resposta imunológica inata ou inflamação.

"Conjugado ou composição imunogênica" é um termo aqui utilizado para significar uma composição útil para estimular ou despertar uma

resposta imunológica específica (ou resposta imunogênica) em um vertebrado. Em algumas modalidades, a resposta imunogênica é protetora ou fornece imunidade protetora, na medida em que permite que o animal vertebrado resista melhor à progressão da infecção ou doença pelo organismo contra o qual a composição imunogênica é dirigida. Um exemplo específico de um tipo de composição imunogênica é uma vacina.

Um "imunógeno" refere-se a um composto, uma composição ou substância que é capaz, sob condições apropriadas, de estimular a produção de anticorpos ou de uma resposta de células T em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas em um animal.

Um "polissacarídeo imunogênico distinto" inclui um polissacarídeo que desperta uma resposta imunológica que difere da resposta imunológica despertada por outro tipo de polissacarídeo. Polissacarídeos imunogênicos distintos podem ter dois ou mais polissacarídeos de diferentes bactérias encapsuladas. Por exemplo, um polissacarídeo pneumocócico é um polissacarídeo imunogênico distinto comparado com um polissacarídeo meningocócico. Polissacarídeos imunogênicos distintos também incluem dois ou mais polissacarídeos de diferentes sorogrupos ou sorotipos. Por exemplo, um polissacarídeo meningocócico do sorogrupo A é um polissacarídeo imunogênico distinto comparado com um polissacarídeo meningocócico do sorogrupo B.

"Inibição ou tratamento de uma doença" inclui a inibição do desenvolvimento total de uma doença ou condição, por exemplo, em um indivíduo que esteja em risco para uma doença, por exemplo, antraz. "Tratamento" refere-se a uma intervenção terapêutica que atenua um sinal ou sintoma de uma doença ou condição patológica após ela ter começado o seu desenvolvimento. Como aqui usado, o termo "atenua", com referência a uma doença, condição patológica ou sintoma, refere-se a qualquer efeito benéfico observável do tratamento. O efeito benéfico pode ser evidenciado, por exemplo, por um surgimento retardado de sintomas clínicos da doença em um indivíduo suscetível, uma redução da gravidade de alguns ou de todos os sintomas clínicos da doença, em um retardo da progressão da doença, uma

redução no número de recidivas da doença, uma melhora da saúde geral ou do bem-estar do indivíduo, ou por outros parâmetros bem-conhecidos na técnica que são específicos para a doença em particular.

Um "peptídeo" inclui uma molécula na qual as unidades estruturais são pelo menos dois resíduos de aminoácidos que estão unidos em conjunto por meio de ligações amida. Um peptídeo inclui um dipeptídeo, um tripeptídeo ou um oligopeptídeo. O termo "resíduo" ou "resíduo de aminoácido" inclui referência a um aminoácido que esteja incorporado em um peptídeo.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um agente especificado suficiente para obter um efeito desejado em um indivíduo tratado com este agente. Por exemplo, ela pode ser a quantidade de um polissacarídeo conjugado multivalente útil no aumento da resistência, prevenção, melhora e/ou tratamento de uma infecção e doença causadas por uma infecção bacteriana em um indivíduo. Idealmente, a quantidade terapeuticamente eficaz de um agente é uma quantidade suficiente para aumentar a resistência, evitar, melhorar e/ou tratar infecção e doença causadas por infecção em um indivíduo, sem causar um efeito citotóxico substancial no indivíduo. A quantidade eficaz de um agente útil para aumentar a resistência, evitar, melhorar e/ou tratar infecção e doença causadas por infecção em um indivíduo dependerá do indivíduo tratado, da gravidade da enfermidade e do modo de administração da composição terapêutica.

Uma vacina é uma composição farmacêutica que desperta uma resposta imunológica profilática ou terapêutica em um indivíduo. Em alguns casos, a resposta imunológica é uma resposta protetora. Tipicamente, uma vacina desperta uma resposta imunológica antígeno-específica a um antígeno de um patógeno, por exemplo, um patógeno bacteriano ou viral, ou a um constituinte celular correlacionado a uma condição patológica. Uma vacina pode incluir um polinucleotídeo, um peptídeo ou polipeptídeo, um polissacarídeo, um vírus, uma bactéria, uma célula ou um ou mais constituintes celulares. Em alguns casos, o vírus, bactéria ou célula pode ser inativado ou atenuado para evitar ou reduzir a probabilidade de infecção, mantendo-se a imunogenicidade do constituinte da vacina.

São descritos novos métodos para a preparação de conjugados imunogênicos multivalentes complexos e vacinas conjugadas. Em uma modalidade, os conjugados multivalentes e as vacinas conjugadas são sintetizados por conjugação de misturas de mais de um polissacarídeo em uma proporção desejada dos polissacarídeos componentes a pelo menos uma proteína veículo, com o uso do método de química de hidrazida. Por causa da alta eficiência da química de hidrazida na conjugação, os polissacarídeos são conjugados eficazmente à(s) proteína(s) veículo(s), de forma que os produtos complexos sintetizados de vacina conjugada resultantes, sem necessitar de procedimentos de purificação trabalhosos e complicados como, por exemplo, cromatografia e/ou precipitação com sulfato de amônio, são eficazes na indução de anticorpos em camundongos contra cada polissacarídeo componente. Os métodos de certas modalidades aqui descritas simplificam a preparação de vacinas conjugadas multivalentes por utilização de reações de conjugação simultâneas em uma única mistura ou batelada de reação que inclui pelo menos dois polissacarídeos imunogênicos distintos. Essa reação simultânea em batelada única elimina a necessidade de múltiplos processos de síntese em paralelo para cada componente polissacarídico da vacina conjugada, como empregado em métodos convencionais para a produção de vacinas conjugadas multivalentes. Em outras palavras, de acordo com métodos convencionais, cada componente individual de polissacarídeo conjugado é preparado por um processo separado, e depois os componentes polissacarídicos conjugados individuais resultantes são misturados em conjunto em uma única formulação de dosagem (vide, por exemplo, U.S. 2005/0002948 A1, parágrafo [0033]). A síntese de conjugados multivalentes e vacinas de acordo com os métodos da invenção atualmente apresentados irá reduzir significativamente os custos de produção e facilitar a aplicação no campo de vacinação, beneficiando, dessa forma, enormemente a saúde pública.

Nos métodos atualmente descritos, a alta eficiência química é aplicada à síntese combinada de vacinas conjugadas multivalentes, uma vez que todos os componentes de polissacarídeos ativados são capazes de for-

mar um conjugado com a proteína ativada, como detectado por HPLC em conjunto com ELISA, com o uso dos respectivos anticorpos PS específicos para detecção.

Em certas modalidades, polissacarídeos menos reativos são inicialmente reagidos com a proteína ativada. Os polissacarídeos mais reativos são então subseqüentemente reagidos com o conjugado intermediário de PS/proteína menos reativo. Os polissacarídeos menos reativos são reagidos primeiro, para fornecerem um tempo de reação mais longo sem competição dos polissacarídeos mais reativos, de forma que uma quantidade maior dos polissacarídeos menos reativos seja conjugada.

A reatividade relativa de um polissacarídeo ativado com uma proteína ativada refere-se à taxa de reação e/ou à quantidade de polissacarídeo conjugada. Uma maior taxa de reação e/ou uma maior quantidade de conjugação obtida são indicativas de um polissacarídeo mais reativo. A reatividade de um polissacarídeo ativado depende de pelo menos vários fatores: do grau de ativação (quanto mais grupos funcionais anexados, maior a reatividade); do comprimento da cadeia (no mesmo grau de ativação, uma cadeia mais longa que contém mais grupos funcionais possui uma reatividade maior); e da estrutura do polissacarídeo (impedimento estérico, estabilidade estrutural etc.).

No caso específico de conjugação por aminação redutiva, o grau de ativação do polissacarídeo é controlado pelo agente de ativação (por exemplo, NaIO_4), pela temperatura, pelo tempo de reação e pela estrutura do polissacarídeo. O agente de ativação quebra a cadeia do polissacarídeo de Mn C, mas não dos polissacarídeos de Mn A, Mn W 135 e Mn Y. No caso específico de conjugação por cianilação, o grau de ativação do polissacarídeo é controlado pelo agente de ativação, pelo pH, pelo tempo de reação e pela densidade de grupo hidroxila do polissacarídeo. Os polissacarídeos de Mn A e Mn C possuem uma densidade de hidroxila mais baixa em relação aos polissacarídeos de Mn W135 e Mn Y. Verificou-se que, em geral, a reatividade de polissacarídeos ativados de Mn C e Mn A é mais baixa em relação à reatividade de polissacarídeos de Mn W135 e Mn Y.

Como descrito anteriormente, também é aqui descrito um novo método para ativação de uma proteína veículo que inclui a reação de uma proteína com hidrazina, carboidrazida, dicloridrato de hidrazina, uma diidrazida (por exemplo, succinil diidrazida ou diidrazida de ácido adípico), ou uma
5 mistura destes, na presença de: (i) cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida e (ii) pelo menos um aminoácido, pelo menos um peptídeo, ou uma mistura de pelo menos um aminoácido e pelo menos um peptídeo. O novo método de ativação de proteína pode ser usado para a conjugação a polissacarídeos para vacinas conjugadas monovalentes ou para misturas de
10 polissacarídeos para vacinas conjugadas multivalentes (ou multivalentes complexas), como descrito abaixo. Aminoácidos úteis incluem aminoácidos de proteínas na forma alfa-L (ou isômero, normalmente denominados L-aminoácidos). Outros aminoácidos incluem na forma alfa-D (D-aminoácidos), na forma beta (beta-aminoácidos), na forma gama, na forma delta e na forma épsilon etc. Aminoácidos ilustrativos incluem lisina, arginina, histidina,
15 glicina, serina, treonina, ácido glutâmico, cisteína, e misturas destes. As faixas de concentração amplas, preferidas e mais preferidas para os aminoácidos presentes na composição de ativação são 1-500 a mM, 20-300 a mM e 36-144 a mM, respectivamente.

20 Embora sem se prender a uma teoria, acredita-se que os aminoácidos também possam ser incorporados à molécula de proteína como a hidrazina durante a reação de ativação. Os resíduos de aminoácidos incorporados podem possivelmente perturbar o ambiente de hidratação da proteína e também gerar impedimento estérico, levando à prevenção da agregação e precipitação da proteína.
25

Em um exemplo, esse método inclui a introdução de pelo menos um grupo hidrazida na proteína veículo por reação da proteína com excesso de hidrazina, carboidrazida, succinil diidrazida ou ADH, catalisada por uma carbodiimida sob condições controladas, incluindo: 1) o tempo de reação, 2)
30 a concentração de EDC, e 3) a concentração de aminoácido ou mistura de aminoácidos na reação. A proteína ativada por hidrazida transportadora resultante pode ser mantida solúvel em pH neutro por um período de tempo

prolongado (por exemplo, por pelo menos cerca de um ano).

Métodos convencionais para a síntese e fabricação de vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína tipicamente empregam reações de conjugação com baixa eficiência (tipicamente cerca de 20%). Isso significa
5 que até 80% do polissacarídeo ativado adicionado são perdidos. Além disso, tipicamente é necessário um processo cromatográfico para purificação dos conjugados do PS não-conjugado. Os métodos sintéticos das modalidades preferidas utilizam a propriedade química característica de grupos hidrazida em um reagente para reagir com grupos ésteres de aldeído ou cianato no
10 outro reagente com um rendimento de conjugado aumentado (tipicamente de até cerca de 60%).

Quando a reação de conjugação evolui com maior eficiência de conjugação, a quantidade de proteína e polissacarídeo não-conjugados que permanece após a reação pode ser suficientemente baixa de modo a tornar
15 sua remoção desnecessária. Conseqüentemente, o processo de purificação do produto conjugado pode ser simplificado, por exemplo, a uma etapa de diafiltração para a remoção de subprodutos de moléculas pequenas. A reação de conjugação baseada em hidrazida pode ser realizada até o término dentro de um a três dias em concentrações de reagente de cerca de 1 a cerca
20 de 50, particularmente cerca de 1 a cerca de 40 mg/ml, ou cerca de 1 a cerca de 50 mg/ml, em proporções de peso de PS/proteína de cerca de 1:5 a cerca de 5:1, de preferência de cerca de 1:2 a cerca de 2: 1 e, principalmente, cerca de 1:1, embora em certas modalidades possam ser preferidas proporções maiores ou menores. A reação de conjugação é, de preferência,
25 realizada em temperaturas de cerca de 4°C a cerca de 40°C, de preferência de cerca de 4, 10, 15, ou 20°C a cerca de 25, 30, ou 35°C, e em um pH de cerca de 6 a cerca de 8,5, de preferência de cerca de 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, ou 6,5 a cerca de 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3 ou 8,4, com as condições ótimas variando de acordo com o
30 polissacarídeo. Conseqüentemente, a vacina conjugada pode ser fabricada com custos menores quando é empregada uma reação de conjugação baseada em hidrazida.

Para superar certas desvantagens dos métodos convencionais para a síntese de vacinas conjugadas, é fornecido um método para conjugação de PSs às proteínas veículo com o uso de química de hidrazida em reações de conjugação por aminação redutiva e cianilação. Grupos de hidrazida que possuem a estrutura -NH-NH_2 são introduzidos nos grupos carboxila dos resíduos de ácido aspártico e/ou ácido glutâmico de moléculas de proteína por reação de carbodiimida com hidrazina, ADH, carboidrazida, ou dihidreto de succinil. Em uma modalidade, a proteína ativada é mantida solúvel em um pH de cerca de 10 a cerca de 11,5, de preferência de cerca de 10,1, 10,2, 10,3 ou 10,4 a cerca de 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,0, 11,1, 11,2, 11,3 ou 11,4 e, principalmente, cerca de 10,5, com um tampão a uma concentração de cerca de 3 ou menos a cerca de 10 mM ou mais, de preferência de cerca de 4 ou 5 mM a cerca de 6, 7, 8, ou 9; mM, antes da conjugação. Tampões adequados incluem, sem limitação, Na_2CO_3 , ácido 3 (cicloexilamino)-1-propanossulfônico (CAPS) e ácido (2-(N-cicloexilamino)etano sulfônico (CHES). Em outra modalidade, a proteína ativada é mantida solúvel em pH neutro ou aproximadamente neutro (por exemplo, pH de cerca de 7 a cerca de 7,5) por ativação da proteína na presença de pelo menos um aminoácido, como descrito acima e exemplificado com mais detalhe abaixo.

A proteína ativada é então reagida com polissacarídeo ativado contendo grupos aldeído (aminação redutiva) ou cianato (conjugação por cianilação) em um pH de cerca de 6 a cerca de 8,5, de preferência de cerca de 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 ou 6,5 a cerca de 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0 na presença de um tampão a uma concentração de cerca de 100 mM ou menos a cerca de 200 mM, de preferência de cerca de 110, 120, 130, 140 ou 150 mM a cerca de 160, 170, 180 ou 190 mM. Tampões adequados incluem, sem limitação, N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanossulfônico) (HEPES), solução salina tamponada com fosfato (PBS), ácido 2-morfolinopropanossulfônico (MOPS) e ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanossulfônico (BES).

Alternativamente, o PS pode ser funcionalizado com grupos hidrazida. O PS ativado pode ser conjugado, em pH 6,5-7,5 com um tampão

forte, a proteínas ativadas contendo grupos aldeído (aminação redutiva). A proteína é mantida solúvel em um pH de cerca de 10,5 com um tampão fraco, até o ponto de conjugação. Por causa da maior reatividade de grupos hidrazida (pKa - 2,6) comparados com o grupo épsilon-amino de lisina (pKa = 10,5) em condições neutras/levemente ácidas, e da solubilidade do conjugado aumentada com o uso de proteína ativada mantida solúvel em um pH em torno de 10,5 antes da conjugação, o rendimento da reação de conjugação é grandemente aumentado.

Os conjugados preparados por esses métodos são imunogênicos em animais experimentais, como demonstrado em experimentos em camundongos. Além disso, a reação de conjugação pode ser realizada eficientemente sem cianoboroidreto de sódio, evitando, dessa forma, a introdução de íon cianeto no produto conjugado. A reação pode ser realizada sob condições de pH levemente ácido ou neutro a 4°C por 1-3 dias ou em temperatura ambiente de um dia para o outro, e não em dias como nos métodos convencionais de conjugação por aaminação redutiva. Isso novamente assegura a produção de vacina conjugada com alto rendimento para polissacarídeos instáveis como, por exemplo, aqueles de *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumonia* tipo 19F e *Neisseria meningitidis* grupo A. Os métodos de modalidades preferidas podem ser empregados para a produção de vacinas conjugadas multivalentes complexas menos dispendiosas, promovendo grandemente, dessa forma, a saúde pública.

O polissacarídeo

O termo "polissacarídeo", como aqui usado, é um termo amplo e é usado em seu significado comum, incluindo, sem limitação, sacarídeos que compreendem diversas unidades de repetição, incluindo, sem limitação, polissacarídeos que possuem 50 ou mais unidades de repetição, e oligossacarídeos que possuem 50 ou menos unidades de repetição. Tipicamente, os polissacarídeos possuem de cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou 95 unidades de repetição a cerca de 2.000 ou mais unidades de repetição e, de preferência, de cerca de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1.000 unidades de repetição até cerca de 1.100, 1.200,

1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800 ou 1.900 unidades de repetição. Oligossacarídeos tipicamente possuem de cerca de 6, 7, 8, 9 ou 10 unidades de repetição a cerca de 15, 20, 25, 30 ou 35 a cerca de 40 ou 45 unidades de repetição.

- 5 Polissacarídeos adequados para uso nas modalidades preferidas incluem polissacarídeos e oligossacarídeos de bactérias encapsuladas. Os polissacarídeos e oligossacarídeos podem ser de qualquer fonte, por exemplo, eles podem ser derivados de bactérias de ocorrência natural, bactérias desenvolvidas por engenharia genética, ou podem ser produzidos sinteticamente. Os polissacarídeos e oligossacarídeos podem ser submetidos a
- 10 uma ou mais etapas de processamento, antes da ativação, por exemplo, purificação, funcionalização, despolimerização com o uso de condições oxidativas leves, desacetilação, e similares. Também podem ser empregadas etapas pós-processamento, se desejado. Qualquer método adequado conhecido na técnica para síntese, preparação e/ou purificação de polissacarí-
- 15 deos e oligossacarídeos adequados pode ser empregado.

- Polissacarídeos e oligossacarídeos para uso em modalidades preferidas incluem polissacarídeos pneumocócicos, por exemplo, dos sorogrupos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C,
- 20 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F; polissacarídeos meningocócicos dos sorotipos A, B, C, W135 e Y, fosfato de polirribossilribitol de polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* do tipo b, polissacarídeos estreptocócicos do grupo B dos sorotipos III e V, e polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*. Outros polissacarídeos de sorotipos pneumocócicos e estreptocócicos do grupo B e sorogrupos meningocócicos também são adequados para uso na invenção,
- 25 bem como outros antígenos de polissacarídeo e oligossacarídeo T-independentes, por exemplo, polissacarídeos ou oligossacarídeos derivados de estreptococos do grupo A, estafilococos, enterococos, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus anthracis*. Embora po-
- 30 lissacarídeos e oligossacarídeos bacterianos sejam particularmente preferidos, lipopolissacarídeos e lipooligossacarídeos bacterianos gram-negativos e seus derivados de polissacarídeo e oligossacarídeo e polissacarídeos e

oligossacarídeos virais também podem ser empregados.

Polissacarídeos com fósforo da cadeia lateral e/ou fósforo na estrutura central são adequados para uso em modalidades preferidas. As reações de conjugação de modalidades preferidas são particularmente adequadas ao uso com polissacarídeos que possuem fósforo na estrutura central. Esses polissacarídeos são sensíveis à fragmentação e à degradação e, portanto, a condição de reação em temperatura baixa (4°C) e a rapidez da reação de conjugação resultam em um conjugado de maior qualidade em função da redução da degradação do polissacarídeo.

Após o término de quaisquer etapas de pré-processamento, o polissacarídeo ou oligossacarídeo é submetido a uma etapa de "ativação". O termo "ativação" refere-se a um tratamento químico do polissacarídeo para o fornecimento de grupos químicos capazes de reagir com a proteína. Em uma modalidade particularmente preferida, a ativação envolve a funcionalização do polissacarídeo ou do oligossacarídeo com grupos aldeído, grupos cetona ou grupos cianato que são reagidos com grupos hidrazida em uma proteína funcionalizada. Alternativamente, o polissacarídeo ou oligossacarídeo pode ser funcionalizado com grupos hidrazida que são reagidos com grupos aldeído ou grupos cetona em uma proteína funcionalizada.

De acordo com uma modalidade, uma mistura de mais de um polissacarídeo pode ser ativada simultaneamente por reação com um único agente de ativação (ou uma mistura de agentes de ativação) em etapa de batelada única. Por exemplo, uma mistura de polissacarídeos de Mn A, Mn C, Mn W135 e Mn Y pode ser reagida com um agente de funcionalização de aldeído em uma reação de batelada única. De acordo com outra modalidade, cada polissacarídeo individual pode ser ativado por reação com um agente de ativação em um processo separado. Os polissacarídeos ativados separadamente podem então ser misturados em conjunto, antes da etapa de conjugação, de forma que os polissacarídeos ativados possam ser simultaneamente conjugados em um processo único.

Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar o polissacarídeo ou oligossacarídeo com grupos cianato.

De preferência, o polissacarídeo ou oligossacarídeo é reagido com tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamoniopiridínio na presença de trietilamina.

Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar o polissacarídeo ou oligossacarídeo com grupos aldeído.

- 5 Certos polissacarídeos e oligossacarídeos possuem grupos aldeído terminais que podem participar da reação de conjugação. Caso o polissacarídeo ou oligossacarídeo seja ativado com grupos aldeído, uma reação preferida envolverá a reação com um agente oxidante, por exemplo, NaIO_4 . Agentes oxidantes possuem o potencial para fragmentar o polissacarídeo ou oligossacarídeo. A fragmentação indesejada pode ser evitada ou controlada por
- 10 meio da seleção do agente oxidante em particular e da concentração do agente oxidante empregada. Grupos cetona também são capazes de reagir com hidrazida e, portanto, a ativação do polissacarídeo ou do oligossacarídeo com grupos cetona pode ser empregada em certas modalidades.

- 15 Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar o polissacarídeo ou oligossacarídeo com grupos hidrazida. Uma reação de funcionalização preferida é a aminação redutiva, em que o polissacarídeo ou oligossacarídeo é reagido com NaIO_4 em uma reação de ativação com periodato para a geração de grupos aldeído, que são então
- 20 reagidos com hidrazina e diidrazida de ácido adípico, seguido por redução subsequente com NaBH_4 . Alternativamente, pode ser empregada uma reação de conjugação por cianilação, em que o polissacarídeo ou o oligossacarídeo é reagido com brometo de cianogênio ou tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamoniopiridínio para introduzir um grupo cianato, que é subsequen-
- 25 temente reagido com hidrazina e diidrazida de ácido adípico. Também pode ser empregada uma reação de carbodiimida, em que o polissacarídeo ou o oligossacarídeo é reagido com diidrazida de ácido adípico na presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida.

- 30 Uma solução fortemente tamponada (em pH de cerca de 6,5 a cerca de 8, a uma concentração elevada de tampão de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM) de polissacarídeo ativado é, de preferência, empregada na reação de conjugação na forma de uma solução fortemente tamponada.

Qualquer tampão adequado pode ser empregado, de preferência um tampão como, por exemplo, N-(2-Hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanossulfônico) ou solução salina tamponada com fosfato.

A proteína

5 O polissacarídeo ou oligossacarídeo ativado é acoplado a uma proteína para gerar uma vacina conjugada. Proteínas adequadas incluem toxinas bacterianas que são veículos imunologicamente eficazes que foram tornados seguros por meios químicos ou genéticos para administração a um indivíduo. Exemplos incluem toxinas bacterianas inativadas, por exemplo, 10 toxóide diftérico, CRM₁₉₇, toxóide tetânico, toxóide de pertussis, LT de *E. coli*, ST de *E. coli* e exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Proteínas da membrana externa bacteriana como, por exemplo, complexo c da membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de ligação de transferrina, pneumólise, proteína pneumocócica de superfície A (PspA), proteína pneumocócica adesina (PsaA) ou proteínas pneumocócicas de superfície BVH-3 e BVH-11 15 também podem ser usadas. Outras proteínas, por exemplo, antígeno protetor (PA) de *Bacillus anthracis* e fator de edema detoxificado (EF) e fator letal (LF) de *Bacillus anthracis*, ovalbumina, hemocianina *keyhole limpet* (KLH), albumina sérica humana, albumina sérica bovina (BSA) e derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD) também podem ser usados. As proteínas 20 são preferivelmente proteínas atóxicas e não-reatogênicas e passíveis de obtenção em quantidade e pureza suficientes que sejam factíveis pelos métodos de conjugação de modalidades preferidas. Por exemplo, a toxina diftérica pode ser purificada de culturas de *Corynebacterium diphtheriae* e quimicamente detoxificada com o uso de formaldeído para gerar uma proteína 25 adequada.

Fragmentos das toxinas ou toxóides nativos, que contêm pelo menos um epitopo de célula T, também são úteis, bem como complexos protéicos da membrana externa, além de certos análogos, fragmentos e/ou 30 fragmentos de análogos das várias proteínas listadas acima. As proteínas podem ser obtidas de fontes naturais, podem ser produzidas por tecnologia recombinante, ou por métodos sintéticos como são conhecidos na técnica.

Análogos podem ser obtidos por vários meios, por exemplo, certos aminoácidos podem ser substitutos para outros aminoácidos em uma proteína, sem perda apreciável de capacidade de ligação interativa com estruturas como, por exemplo, regiões de ligação de antígeno de anticorpos ou sítios de ligação em moléculas de substrato. Outras proteínas também podem ser empregadas, tais como aquelas que contêm grupos ácido glutâmico ou ácido aspártico expostos na superfície.

Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar a proteína com grupos hidrazida. Métodos convencionais para a preparação de proteínas modificadas por hidrazida incluem catálise por EDC e um processo em duas etapas com a utilização de iodoacetato de N-succinimidila e tiol hidrazida por meio de grupos ϵ -amino de lisina da proteína. Vide King *et al.*, *Biochemistry* 1986; 25: 5.774-5.779. Proteínas modificadas preparadas por catálise por EDC tipicamente precisam ser fracionadas a fim de que se tornem adequadas para o uso em conjugação, e o processo em duas etapas é trabalhoso. Conseqüentemente, geralmente não se prefere empregar esses métodos para a preparação da proteína modificada por hidrazida. No entanto, em certas modalidades, tais métodos podem ser aceitáveis ou até mesmo desejáveis.

De preferência, grupos hidrazida são introduzidos em proteínas por meio dos grupos carboxila de resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico na proteína com o uso de uma reação de carbodiimida, por exemplo, por reação com hidrazina, carboidrazida, succinil diidrazida, diidrazida de ácido adípico, cloreto de hidrazina (por exemplo, dicloridrato de hidrazina) ou quaisquer outras diidrazidas na presença de EDC. EDC é empregada como catalisador para ativar e modificar o reagente de proteína com hidrazina ou a diidrazida. Qualquer carbodiimida hidrossolúvel, incluindo EDC, pode ser usada como catalisador. As proteínas catalisadas por EDC geralmente possuem uma tendência para polimerizar e precipitar. Vide Schneerson *et al.*, *Infect. Immun.* 1986, 52: 519-528; Shafer *et al.*, *Vaccine* 2000; 18(13): 1.273-1.281; e Inman *et al.*, *Biochemistry* 1969; 8: 4.074-4.082. A agregação e precipitação da proteína ativada depende, em parte, de seu pH ambiente. Con-

seqüentemente, a tendência para polimerizar e precipitar pode ser controlada mantendo-se essas proteínas modificadas por hidrazida solúveis em uma solução tamponada. Trocando-se o tampão da mistura de reação com a finalidade de manter a proteína ativada em um pH de cerca de 10,5, a proteína
5 ativada permanece solúvel e estável para conjugação. Qualquer tampão adequado pode ser empregado. De preferência, é empregado um tampão fraco como, por exemplo, Na_2CO_3 , a uma concentração baixa de cerca de 3 mM a cerca de 10 mM.

A proteína modificada por hidrazida tamponada pode então ser
10 empregada na preparação de conjugados de proteína-polissacarídeo, sem precipitação quando adicionados ao polissacarídeo ativado em um pH de cerca de 6 a 8,5, de preferência de cerca de 6,5 a cerca de 8. Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar a proteína com grupos aldeído. De preferência, a proteína é reagida com 1-amino-2,3-
15 propanodiol na presença de EDC, seguida por oxidação com NaIO_4 . Açúcares amino como, por exemplo, glicosamina, galactosamina, e similares, podem ser usados no lugar de 1-amino-2,3-propanodiol. Nessa reação, EDC também é empregada como catalisador para ativar e modificar o reagente de proteína com o aminodiol por meio dos grupos carboxila de resíduos de ácido
20 aspártico e ácido glutâmico da proteína.

A proteína também pode ser ativada na presença de um aminoácido ou de misturas de aminoácidos, como descrito acima, e mantida solúvel em pH neutro de cerca de 7 a cerca de 7,5.

Preparação de Conjugados por aminação redutiva

25 Conjugados podem ser preparados por meio da reação de grupos aldeído e hidrazida (aminação redutiva). A reação de conjugação de aminação redutiva pode ser empregada para conjugar um reagente modificado por hidrazida (proteína ou polissacarídeo) ao outro componente que contém grupos aldeído.

30 Na aminação redutiva convencional, a reação entre aldeído e amino grupos é reversível e desfavorável, de tal forma que o cianoboroidreto de sódio é necessário para facilitar a conjugação por conversão da ligação

dupla C=N em uma ligação simples C-N para tornar todo o evento de amina-
ção redutiva irreversível. Em contraste, a reação de conjugação de amina-
ção redutiva de modalidades preferidas evolui sem o auxílio de cianoboroi-
dreto de sódio, por causa da alta eficiência da reação de hidrazida-aldeído.

- 5 Ao final da reação de conjugação de amina-ção redutiva, o boroidreto de só-
dio ou outro redutor adequado é empregado para reduzir a ligação dupla
C=N em uma ligação simples C-N, bem como para reduzir quaisquer grupos
aldeído residuais em grupos álcool. A reação de conjugação de amina-ção
redutiva de modalidades preferidas evita a contaminação do conjugado re-
10 sultante com cianeto, um subproduto do cianoboroidreto de sódio.

- Para reduzir a precipitação da proteína ativada durante a reação
de conjugação, a proteína ativada está, de preferência, na forma de uma
solução fracamente tamponada a uma baixa concentração de tampão de
cerca de 3 mM a cerca de 10 mM, que é adicionada a uma solução de polis-
15 sacarídeo ativado fortemente tamponada (em um pH de cerca de 6,5 a cerca
de 7,5, com uma alta concentração de tampão de cerca de 100 mM a cerca
de 200 mM). De preferência, o pH da solução de proteína ativada é tampo-
nado até um pH de cerca de 10 a cerca de 11,5, principalmente até um
pH de cerca de 10,5. A solução de polissacarídeo ativado é, de preferência,
20 fortemente tamponada até um pH de cerca de 6 a cerca de 8, principal-
mente, até um pH de cerca de 6,5 a cerca de 7,5. A reação de amina-ção
redutiva de hidrazida-aldeído evolui em uma taxa rápida, e o efeito precipi-
tante de um pH abaixo de 10,5 (por exemplo, um pH tão baixo quanto cerca
de 8,5 a cerca de 9,5) na proteína ativada é superado pelas propriedades
25 moleculares do reagente de polissacarídeo ativado.

Preparação de conjugados por conjugação por cianilação

- Os conjugados podem ser preparados por meio da reação de
hidrazida e grupos cianato (conjugação por cianilação). A reação de conju-
gação por cianilação é eficiente e reversível, favorecendo a formação do
30 produto. Em certas modalidades, são empregados agentes de bloqueio para
a remoção de grupos cianato residuais. No entanto, a adição de um agente
de bloqueio à mistura de reação retrocede a reação de conjugação e reduz o

rendimento da conjugação em 5-12%. O efeito de vários agentes de bloqueio sobre o rendimento foi investigado. O polissacarídeo pneumocócico PS Pn 18C foi ativado com CDAP e depois conjugado ao toxóide tetânico ativado por hidrazida (TTH) de um dia para o outro. Foram adicionadas cinco

5 alíquotas com água ou um agente de bloqueio a 0,2 M. Após incubação de 4 horas, as amostras foram analisadas por HPSEC com o uso de uma coluna Waters Ultrahidrogel 2000 com um monitor de 280 nm. O rendimento da conjugação de cada amostra, fornecido na Tabela C, foi determinado com o

10 % da área do pico de conjugado em 15,5 minutos em relação à proteína total, ou seja, o pico de conjugado mais o pico de TTH livre (em 22 minutos). Embora em certas modalidades possa ser desejável empregar agentes de bloqueio para extinguir os grupos cianato residuais restantes, prefere-se geralmente evitar seu uso a fim de evitar a redução no rendimento de conjugado.

15 Tabela C

Agente de bloqueio (a 0,2 M)	Rendimento da conjugação	% de controle	% de redução
Nenhum (controle)	75	100	0
ADH	63	84	16
Hidrazina	70	93	7
Glicina	66	89	11
Etanolamina	65	87	13

Para a remoção de grupos cianato residuais no produto de conjugação sem utilizar um agente de bloqueio, o tempo de conjugação pode ser prolongado. De preferência, a conjugação é realizada em uma temperatura de cerca de 0°C a cerca de 5°C por cerca de 36 a cerca de 48 horas,

20 principalmente a cerca de 4°C por cerca de 36 horas, seguida por um adicional de cerca de 18 a 24 horas em uma temperatura de cerca de 20°C a cerca de 25°C, principalmente a cerca de 18 horas a cerca de 20 a 24°C, de forma que os grupos cianato residuais reajam com água e se decomponham. Tempos de conjugação mais longos ou mais curtos e/ou temperaturas

25 de conjugação maiores ou menores podem ser empregados, e seqüências diferentes de etapas em vários tempos e temperaturas podem ser efetuadas,

como desejado. É desejável, no entanto, efetuar a reação de conjugação, pelo menos inicialmente, em temperaturas baixas, de preferência de cerca de 0°C a cerca de 5°C, mais preferivelmente a cerca de 4°C, de modo a reduzir o grau de precipitação do conjugado.

- 5 Com altos rendimentos da conjugação e alta imunogenicidade do produto de conjugação, os processos de purificação como, por exemplo, cromatografia em coluna e/ou precipitação com sulfato de amônio, do conjugado de polissacarídeo não-conjugado podem não ser necessários. No entanto, em certas modalidades, pode ser desejável realizar uma ou mais etapas de purificação.

Os conjugados

- Ambos os reagentes contêm múltiplos grupos reativos por molécula. Uma molécula de polissacarídeo ativado pode reagir com e formar mais de uma ligação com mais de uma molécula de proteína ativada. Da mesma forma, uma molécula de proteína ativada pode reagir com e formar mais de uma ligação com mais de uma molécula de polissacarídeo ativado.

- Portanto, o produto conjugado é uma mistura de várias estruturas em treliça entrecruzadas do tipo matriz. Por exemplo, uma ligação simples pode estar presente, ou 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais ligações podem estar presentes. O número médio de ligações entre um polissacarídeo e uma proteína pode ser ajustado, como preferido. O número médio preferido de ligações pode depender do tipo de polissacarídeo, do tipo de proteína, do método de conjugação, das condições de reação, e similares. Geralmente, uma média de 1 ligação a cerca de 2, 3, 4 ou 5 ligações está presente, de modo a evitar interferência com a habilidade da proteína para estimular o sistema imunológico por superconjugação, e de forma a não causar mudanças na estrutura do polissacarídeo. No entanto, em certas modalidades, mais de 5 ligações podem ser toleradas ou até mesmo desejáveis.

- 30 Como descrito anteriormente, conjugados multivalentes complexos são produzidos pelos métodos aqui descritos. O número de polissacarídeos imunogênicos distintos incluídos em um conjugado multivalente com-

plexo não é limitado, e pode variar de 2 a 28, de preferência 5 a 25 e, principalmente, 15, em certas modalidades. O número de proteínas veículo diferentes incluídas em um conjugado multivalente complexo também não é limitado, e pode variar de 1 a 10, de preferência 4 a 6 e, principalmente, 5, em certas modalidades. Por exemplo, uma molécula de proteína veículo pode ser conjugada a 2, 3, 4, 5, 6 etc. polissacarídeos imunogênicos distintos. Um conjugado da construção pode incluir uma estrutura em treliça que inclui duas ou mais moléculas de proteína diferentes conjugadas entre si e 2, 3, 4, 5, 6 etc. polissacarídeos imunogênicos distintos.

Após conjugação, o conjugado pode ser purificado por qualquer método adequado. A purificação é empregada para a remoção de polissacarídeo não-reagido, proteína, ou subprodutos de pequena molécula da reação. Os métodos de purificação incluem ultrafiltração, cromatografia por exclusão de tamanho, centrifugação por gradiente de densidade, cromatografia por interação hidrofóbica, fracionamento com sulfato de amônio, e similares, como são conhecidos na técnica. Como discutido acima, as reações de conjugação de modalidades preferidas evoluem com rendimento maior, e geram menos subprodutos de reação de pequena molécula indesejáveis. Consequentemente, pode não ser necessária purificação, ou apenas um pequeno grau de purificação como, por exemplo, diafiltração, pode ser desejável. O conjugado pode ser concentrado ou diluído, ou processado em qualquer forma adequada para uso em composições farmacêuticas, como desejado.

Métodos de tratamento

Conjugados preparados de acordo com a modalidade preferida são administrados a um indivíduo em uma dose imunologicamente eficaz em uma forma adequada para evitar e/ou tratar doenças infecciosas. O termo "indivíduo", como aqui usado, refere-se aos animais como, por exemplo, mamíferos. Por exemplo, mamíferos contemplados incluem seres humanos, primatas, cachorros, gatos, carneiros, gado, cabras, porcos, cavalos, camundongos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, e similares. Os termos "indivíduo", "paciente" e "hospedeiro" são usados de forma intercambiável. Como aqui usado, uma dose "imunologicamente eficaz" da vacina conjugada

é uma dose que é adequada para despertar uma resposta imunológica. A dosagem específica depende da idade, do peso e da condição médica do indivíduo a ser tratado, bem como do método de administração. Doses adequadas podem ser facilmente determinadas por aqueles versados na técnica.

Composições farmacêuticas que compreendem vacinas conjugadas de modalidades preferidas podem oferecer várias vantagens em relação às vacinas convencionais, incluindo imunogenicidade aumentada de antígenos fracamente imunogênicos, redução potencial na quantidade de antígeno usada, imunizações de reforço menos freqüentes, eficácia aumentada, estimulação preferencial de imunidade ou direcionamento potencial de respostas imunológicas. As vacinas podem ser administradas a um indivíduo por várias vias, como discutido abaixo, incluindo, sem limitação, a via de administração parenteral (por exemplo, por técnicas de injeção e infusão intra-cisterna), intradérmica, transmembranosa, transdérmica (incluindo tópica), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intra-arterial, intra-lesional, subcutânea, oral e intranasal (por exemplo, inalação). Vacinas conjugadas podem ser administradas por injeção em bolo ou por infusão contínua, bem como por administração localizada, por exemplo, em um local de doença ou de lesão. A vacina conjugada pode ser opcionalmente administrada em um veículo farmacêutica ou fisiologicamente aceitável.

O termo "vacina", como aqui usado, é um termo amplo e é usado em seu significado comum, incluindo, sem limitação, conjugados de modalidades preferidas ou de outros antígenos formulados com adjuvantes, diluentes, excipientes, veículos, e outras substâncias farmaceuticamente aceitáveis. O termo "farmaceuticamente aceitável" é usado para se referir a um material atóxico compatível com um sistema biológico como, por exemplo, uma célula, cultura de células, tecido ou organismo.

Protocolos de imunização para uso com os conjugados de modalidades preferidas fornecem composições e métodos para a prevenção ou tratamento de uma doença, um distúrbio e/ou uma infecção em um indivíduo. O termo "tratamento", como aqui usado, é um termo amplo e é usado

em seu significado comum, incluindo, sem limitação, tratamento curativo, preventivo, profilático, paliativo e/ou atenuante.

As composições de vacina são preferivelmente estéreis e contêm uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz do conjugado em uma unidade de peso ou volume adequada à administração a um indivíduo. O termo "veículo farmaceuticamente aceitável", como aqui usado, significa um ou mais enchimentos compatíveis sólidos ou líquidos, diluentes ou substâncias de encapsulação que são adequadas à administração em um indivíduo. O termo "veículo" denota um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o ingrediente ativo é combinado para facilitar a aplicação. As características do veículo dependem da via de administração. Veículos fisiológica e farmaceuticamente aceitáveis incluem diluentes, enchimentos, sais, tampões, estabilizantes, solubilizantes e outros materiais que são bem-conhecidos na técnica.

Os componentes das composições farmacêuticas também são capazes de ser co-misturados com os conjugados da modalidade preferida, e uns com os outros, de tal forma que não haja interação que substancialmente prejudique a eficácia farmacêutica desejada.

A formulação das vacinas conjugadas de modalidades preferidas em composições farmacêuticas pode ser obtida com a utilização de métodos conhecidos na técnica. As composições de vacina também podem conter um ou mais adjuvantes. Adjuvantes adequados incluem, por exemplo, adjuvantes de alumínio, por exemplo, hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, adjuvante de Freund, BAY, DC-chol, pcpp, monofosforil lipídeo A, CpG, QS-21, toxina colérica e formil metionil peptídeo. Vide, por exemplo, "Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach", 1995 (M. F. Powell e M. J. Newman, eds., Plenum Press, N.Y.).

A dosagem de vacina conjugada a ser administrada a um indivíduo e o regime de administração podem ser determinados de acordo com técnicas padronizadas bem-conhecidas por aqueles versados nas técnicas farmacêuticas e veterinárias, levando-se em conta fatores tais como o uso pretendido, o antígeno em particular, o adjuvante (se presente), a idade, o

sexo, a idade, a espécie, a condição geral, doenças e/ou tratamentos anteriores.

res e a via de administração. Doses preliminares podem ser determinadas de acordo com testes em animais, e o escalonamento de dosagens para administração em seres humanos é feito de acordo com práticas aceitáveis na técnica como, por exemplo, experimentos padronizados de dosagem. Por exemplo, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de testes do nível de anticorpos séricos. A dosagem depende da atividade específica do conjugado, e pode ser determinada facilmente por experimentação de rotina.

- 10 Na prática de protocolos de imunização para tratamento e/ou prevenção de doenças especificadas, uma quantidade terapeuticamente eficaz de conjugado é administrada a um indivíduo. O termo "quantidade eficaz" significa a quantidade total de agente terapêutico (por exemplo, conjugado) ou de outro componente ativo que é suficiente para exibir um benefício significativo ao indivíduo como, por exemplo, resposta imunológica aumentada, tratamento, cicatrização, prevenção ou melhora da condição médica relevante (doença, infecção, ou similares), ou um aumento da taxa de tratamento, cicatrização, prevenção ou melhora dessas condições. Quando uma "quantidade eficaz" é aplicada a um agente terapêutico individual administrado isoladamente, o termo refere-se somente àquele agente terapêutico. Quando aplicado a uma combinação, o termo refere-se às quantidades combinadas dos ingredientes que resultam no efeito terapêutico, sejam eles administrados em combinação, em série ou simultaneamente. Como aqui usado, a frase "administração de quantidade eficaz" de um agente terapêutico significa que o indivíduo é tratado com o(s) referido(s) agente(s) terapêutico(s) em uma quantidade e por um período suficiente para induzir uma melhora e, de preferência, uma melhora sustentada, em pelo menos um indica-
- 15
- 20
- 25

distúrbio. Vários indicadores que refletem a extensão da doença do paciente podem ser avaliados para se determinar se a quantidade e o período do tratamento são suficientes. O valor de base para o indicador ou indicadores escolhidos pode ser estabelecido por exame do paciente antes da administração da primeira dose do agente terapêutico, ou com base em valores estatísticos gerados a partir de uma população de pacientes saudáveis. Caso o agente terapêutico seja administrado para o tratamento de sintomas agudos, a primeira dose será administrada logo que for praticamente possível. A melhora é induzida por administração de agentes terapêuticos até que o indivíduo manifeste uma melhora em relação aos valores de base para o indicador ou indicadores escolhidos. No tratamento de condições crônicas, esse grau de melhora é obtido administrando-se repetidamente os agentes terapêuticos ao longo de um período de tempo, por exemplo, por um, dois ou três meses ou mais, ou indefinidamente. Uma única dose pode ser suficiente para tratar ou evitar certas condições. O tratamento pode ser continuado indefinidamente no mesmo nível ou em uma dose ou frequência reduzida, independentemente da condição do paciente, se desejado. Após o tratamento ter sido reduzido ou interrompido, ele pode mais tarde ser reiniciado no nível original, caso os sintomas reapareçam.

20 Geralmente, a quantidade de conjugado que fornece uma dose eficaz ou uma dose terapeuticamente eficaz para vacinação contra infecção bacteriana é de cerca de 1 μg ou menos a cerca de 100 μg ou mais, de preferência de cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 μg a cerca de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou 95 μg por kg de peso corporal. Uma dosagem eficaz pode necessitar de menos anticorpos caso o tempo pós-infecção decorrido seja menor, na medida em que há menos tempo para que as bactérias proliferem. Uma dosagem eficaz também pode depender da carga bacteriana no momento do diagnóstico. Múltiplas injeções administradas ao longo de um período de dias podem ser consideradas para uso terapêutico.

30 As vacinas conjugadas podem ser administradas como uma dose única ou em uma série que inclui um ou mais reforços. Por exemplo, uma

criança pequena ou uma criança pode receber uma dose única precocemente em sua vida, e depois pode receber uma dose de reforço até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais anos mais tarde. A dose de reforço gera anticorpos de células B sensibilizadas, ou seja, uma resposta anamnésica. Ou seja, a vacina conjugada desperta uma resposta funcional primária de anticorpo elevada em crianças pequenas ou crianças, e é capaz de despertar uma resposta anamnésica após uma administração de reforço, demonstrando que a resposta imunológica protetora despertada pela vacina conjugada é de longa duração.

10 As vacinas conjugadas podem ser formuladas em preparações líquidas para, por exemplo, administração oral, nasal, anal, retal, bucal, vaginal, peroral, intragástrica, mucosa, perlingual, alveolar, gengival, na mucosa olfatória ou respiratória. Formas adequadas para essa administração incluem suspensões, xaropes e elixires. As vacinas conjugadas também podem ser formuladas para administração injetável parenteral, subcutânea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa, liberação sustentada por implantes, ou administração por colírios. Formas adequadas para essa administração incluem suspensões e emulsões estéreis. Essas vacinas conjugadas podem estar misturadas com um veículo, diluente ou excipiente adequado como, por exemplo, água estéril, soro fisiológico, glicose, e similares. As vacinas conjugadas também podem ser liofilizadas. As vacinas conjugadas podem conter substâncias auxiliares como, por exemplo, agentes umidificantes ou emulsificantes, agentes de tamponamento do pH, aditivos de gelificação ou de aumento da viscosidade, conservantes, agentes flavorizantes, agentes corantes, e similares, dependendo da via de administração e da preparação desejadas. Textos-padrão, por exemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins; 20ª edição (1º de junho de 2003) e "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co.; 18ª e 19ª edições (dezembro de 1985 e junho de 1990, respectivamente), aqui incorporados por referência em sua totalidade, podem ser consultados para a preparação de preparações adequadas, sem experimentação desnecessária. Tais preparações podem incluir agentes de formação de

complexos, íons metálicos, compostos poliméricos como, por exemplo, ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogéis, dextrana, e similares, lipossomos, microemulsões, micelas, vesículas unilamelares ou multilamelares, fantasmas de eritrócitos ou esferoblastos. Lipídeos adequados para formulação lipossômica incluem, sem limitação, monoglicerídeos, diglicerídeos, sulfatadas, lisolecitina, fosfolipídeos, saponina, ácidos biliares, e similares. A presença desses componentes adicionais pode influenciar o estado físico, a solubilidade, estabilidade, a taxa de liberação *in vivo* e a taxa de depuração *in vivo*, e eles são, dessa forma, escolhidos de acordo com a aplicação desejada, de tal forma que as características do veículo sejam ajustadas à via de administração selecionada.

As vacinas conjugadas são fornecidas preferivelmente como suspensões líquidas ou como produtos liofilizados. Preparações líquidas adequadas incluem, por exemplo, soluções aquosas isotônicas, suspensões, emulsões ou composições viscosas que são tamponadas até um pH selecionado. Preparações transdérmicas incluem loções, géis, sprays, pomadas ou outras técnicas adequadas. Caso a administração nasal ou respiratória (mucosa) seja desejada (por exemplo, inalação ou insuflação em aerossol), as composições podem estar em uma forma e dispensadas por um dispensador de spray por compressão, um dispensador de bomba ou um dispensador de aerossol. Aerossóis estão normalmente sob pressão por meio de um hidrocarboneto. Dispensadores de bomba podem preferivelmente dispensar uma dose metrificada ou uma dose que possui um tamanho de partícula em particular, como discutido abaixo.

Quando na forma de soluções, suspensões e géis, as formulações do conjugado podem tipicamente conter uma quantidade importante de água (preferivelmente água purificada), além do ingrediente ativo. Quantidades menores de outros ingredientes como, por exemplo, agentes de ajuste do pH, emulsificantes, agentes de dispersão, agentes de tamponamento, conservantes, agentes umidificantes, agentes de gelificação, agentes corantes, e similares, também podem estar presentes.

As composições são preferivelmente isotônicas em relação ao

sangue ou a outro líquido do corpo do receptor. A isotonicidade das composições pode ser obtida com o uso de tartarato de sódio, propileno glicol ou outros solutos inorgânicos ou orgânicos. O cloreto de sódio é particularmente preferido. Agentes de tamponamento podem ser empregados, por exemplo, ácido acético e seus sais, ácido cítrico e seus sais, ácido bórico e seus sais, e ácido fosfórico e seus sais. Veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer-lactato ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de líquidos e nutrientes, reabastecedores de eletrólitos (como, por exemplo, aqueles que se baseiam em dextrose de Ringer), e similares.

A viscosidade das composições pode ser mantida no nível selecionado com o uso de um agente espessante farmacologicamente aceitável. Prefere-se metilcelulose pelo fato de ser fácil e economicamente disponível e de ser um material fácil de ser trabalhado. Outros agentes espessantes adequados incluem, por exemplo, goma xantana, carboximetil celulose, hidroxipropil celulose, carbômero, e similares. A concentração preferida do espessante pode depender do agente selecionado. O ponto importante é o uso de uma quantidade que possa obter a viscosidade selecionada. Composições viscosas são normalmente preparadas a partir de soluções pela adição desses agentes espessantes.

Um conservante farmacologicamente aceitável pode ser empregado para aumentar o prazo de validade das composições. Álcool benzílico pode ser adequado, embora vários conservantes, incluindo, por exemplo, parabenos, timerosal, clorobutanol ou cloreto benzalcônio, também possam ser empregados. Uma concentração adequada do conservante pode ser de 0,02% a 2%, com base no peso total, embora possa haver uma variação apreciável, dependendo do agente selecionado.

A liberação pulmonar do conjugado também pode ser empregada. O conjugado é liberado aos pulmões de um mamífero durante a inalação e atravessa o revestimento epitelial do pulmão até alcançar a corrente sanguínea. Uma ampla faixa de dispositivos mecânicos projetados para a liberação pulmonar de produtos terapêuticos pode ser empregada, incluindo,

sem limitação, nebulizadores, inaladores de dose metrificada e inaladores de pó, todos familiares àqueles versados na técnica. Esses dispositivos empregam formulações adequadas à liberação do conjugado. Tipicamente, cada formulação é específica para o tipo de dispositivo empregado, e pode envolver o uso de um material propelente apropriado, além de diluentes, adjuvantes e/ou veículos úteis em terapia.

O conjugado é vantajosamente preparado para liberação pulmonar em forma particulada com um tamanho de partícula médio de 0,1 μm ou menos a 10 μm ou mais, mais preferivelmente de cerca de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 ou 0,9 μm a cerca de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, ou 9,5 μm para liberação pulmonar. Veículos farmacologicamente aceitáveis para liberação pulmonar dos conjugados incluem carboidratos como, por exemplo, trealose, manitol, xilitol, sacarose, lactose e sorbitol. Outros ingredientes para uso em formulações podem incluir DPPC, DOPE, DSPC e DOPC. Podem ser usados tensoativos naturais ou sintéticos, incluindo polietileno glicol e dextranas, por exemplo, ciclodextrana. Sais biliares e outros intensificadores relacionados, além de celulose e derivados de celulose, e aminoácidos, também podem ser usados. Lipossomos, microcápsulas, microesferas, complexos de inclusão e outros tipos de veículos também podem ser empregados.

Formulações adequadas para uso com um nebulizador, de jato ou ultra-sônico, tipicamente compreendem o conjugado dissolvido ou suspenso em água, em uma concentração de cerca de 0,01 ou menos a 100 mg ou mais de conjugado por ml de solução, de preferência de cerca de 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mg a cerca de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ou 90 mg de conjugado por ml de solução. A formulação também pode incluir um tampão e um açúcar simples (por exemplo, para estabilização da proteína e regulação da pressão osmótica). A formulação para nebulizador também pode conter um tensoativo, para reduzir ou evitar a agregação do conjugado induzida na superfície causada por atomização da solução na formação do aerossol.

Formulações para uso com um dispositivo inalador de dose me-

trificada geralmente compreendem um pó finamente dividido contendo o composto da invenção suspenso em um propelente com o auxílio de um tensoativo. O propelente pode incluir propelentes convencionais como, por exemplo, clorofluorocarbono, hidroclorofluorocarbonos, hidrofluorocarbonos, e hidrocarbonetos, por exemplo, triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoretanol, e 1,1,1,2-tetrafluoretano, e combinações destes.

Tensoativos adequados incluem trioleato de sorbitano, lecitina de soja e ácido oléico.

Formulações para dispensa de um dispositivo inalador de pó tipicamente compreendem um pó seco finamente dividido contendo o conjugado, opcionalmente incluindo um agente de formação de volume, por exemplo, lactose, sorbitol, sacarose, manitol, trehalose ou xilitol, em uma quantidade que facilita a dispersão do pó pelo dispositivo, tipicamente de cerca de 1 % do peso ou menos de 99 % do peso ou mais, da formulação, de preferência de cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50% do peso a cerca de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ou 90% do peso da formulação.

Quando o conjugado é administrado por injeção intravenosa, cutânea, subcutânea ou outra injeção, a vacina conjugada está, de preferência, na forma de uma solução aquosa isenta de pirogênio, parenteralmente aceitável. A preparação de soluções parenteralmente aceitáveis com pH, isotonicidade, estabilidade adequados, e similares, está dentro dos conhecimentos da técnica. Uma composição farmacêutica preferida para injeção preferivelmente contém um veículo isotônico, por exemplo, injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de dextrose, injeção de dextrose e cloreto de sódio, injeção de Ringer-lactato ou outros veículos, como são conhecidos na técnica. As composições farmacêuticas também podem conter estabilizantes, conservantes, tampões, antioxidantes, ou outros aditivos conhecidos por aqueles versados na técnica.

A duração da injeção pode variar, dependendo de vários fatores, e pode compreender uma injeção única administrada ao longo de poucos segundos ou menos, até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 horas ou mais de administração intravenosa

contínua.

O conjugado pode ser administrado topicamente, sistemicamente ou localmente, por meio de um líquido ou gel, ou como um implante ou dispositivo.

- 5 Os conjugados de modalidades preferidas, ou os métodos de conjugação de modalidades preferidas, podem ser úteis na preparação de vacinas para o tratamento de diversas infecções bacterianas, incluindo infecções por *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps. (por exemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *At. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo do Grupo A), *Streptococcus agalaciae* (estreptococo do Grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patogênica, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* At., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*,
10 *Treponema pertenuae*, *Leptospira* e *Actinomyces israeli*.
15
20

- Certos métodos das modalidades preferidas também podem ter utilização na preparação de vacinas para o tratamento ou a vacinação de indivíduos contra câncer, por exemplo, sarcomas e carcinomas de mamíferos, por exemplo, fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma de cólon, câncer pancreático, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, adenocarcinoma, carcinoma de glândulas sudoríparas, carcinoma de glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, he-
- 25
30

patoma, carcinoma de ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmão, carcinoma de pulmão de pequenas células, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, endimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurônio acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias como, por exemplo, leucemia linfocítica aguda e leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritroleucemia); leucemia crônica (leucemia mielocítica crônica (granulocítica) e leucemia linfocítica crônica); e policitemia Vera, linfoma (doença de Hodgkin e doença não Hodgkin), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström e doença da cadeia pesada, distúrbios linfoproliferativos, incluindo síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), leucemia linfoblástica crônica, leucemia de células pilosas, leucemia linfática crônica, linfoma de células T periféricas, linfoma linfocítico pequeno, linfoma de células do manto, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de células T positivo para o vírus de Epstein-Barr, linfoma histiocítico, doença de Hodgkin, linfoma agressivo difuso, leucemias linfáticas agudas, doença linfoproliferativa gama T, linfoma cutâneo de células B, linfoma cutâneo de células T (ou seja, micose fungóide) e síndrome de Szary.

Os conjugados podem ser administrados em combinação com várias vacinas usadas atualmente ou em desenvolvimento, destinadas a indivíduos humanos ou não-humanos. Exemplos de vacinas para indivíduos humanos e dirigidas a doenças infecciosas, incluem a vacina combinada de toxóides diftérico e tetânico; vacina de pertussis de célula inteira; a vacina inativada de influenza; a vacina pneumocócica 23-valente; a vacina viva de sarampo; a vacina viva de caxumba; vacina viva de rubéola; vacina de tuberculose com bacilo de Calmette-Guerin I (BCG); vacina de hepatite A; vacina de hepatite B; vacina de hepatite C; vacina anti-rábica (por exemplo, vacina de célula diplóide humana); vacina inativada de pólio; vacina de polissacarídeo meningocócico; vacina conjugada meningocócica quadrivalente; vacina de vírus vivo contra a febre amarela; vacina tifóide morta de célula

inteira; vacina contra cólera; vacina de vírus morto contra encefalite japonesa B; vacina de adenovírus; vacina de citomegalovírus; vacina de rotavírus; vacina de varicela; vacina contra antraz; vacina contra varíola; e outras vacinas comercialmente disponíveis e experimentais.

- 5 Os conjugados podem ser fornecidos a um médico assistente ou a outro profissional de saúde na forma de um kit. O kit é uma embalagem que abriga um recipiente que contém a vacina conjugada e instruções para administração da vacina conjugada a um indivíduo. O kit também pode opcionalmente conter um ou mais outros agentes terapêuticos. O kit pode opcionalmente conter uma ou mais ferramentas diagnósticas e instruções para uso. Por exemplo, uma coquetel de vacinas contendo duas ou mais vacinas pode ser incluído, ou composições farmacêuticas separadas contendo diferentes vacinas ou agentes terapêuticos. O kit também pode conter doses separadas da vacina conjugada para administração serial ou sequencial. O
- 10 kit pode conter dispositivos de liberação adequados, por exemplo, seringas, dispositivos de inalação, e similares, juntamente com instruções para administração dos agentes terapêuticos. O kit pode opcionalmente conter instruções para armazenamento, reconstituição (se aplicável) e administração de qualquer um ou todos os agentes terapêuticos incluídos. Os kits podem incluir diversos recipientes que refletem o número de administrações a serem
- 15 dadas a um indivíduo. Caso o kit contenha um primeiro e um segundo recipientes, diversos destes poderão estar presentes.

Exemplos - MATERIAIS E MÉTODOS

- 25 Materiais - O toxóide tetânico (TT) era de Lederle Vaccines, Pearl River, NY e Serum Institute of India, Pune, Índia. Os polissacarídeos dos grupos meningocócicos A e C (PS de Mn A e PS de Mn C, respectivamente) eram da Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. PS de Mn A também foi obtido de SynCo Bio Partners, Amsterdam, Holanda. PSs de Mn W135 e Y eram de Aventis Pasteur e Chiron. Hidrazina, carboidrazida, diidrazida de ácido adípico (ADH), hidrazida acética, cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC), N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanossulfônico) (HEPES), periodato de sódio, boroidreto de só-
- 30

dio, cianoboroidreto de sódio, tetrafluoroborato de 4-ciano-
dimetilaminopirídio (CDAP) e 1-amino-2,3-propanodiol e vários aminoácidos
foram adquiridos de Sigma/Aldrich Chemical Company. Kits de ensaio de
TNBSA (ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico) e BCA (ácido bicinconínico)
5 foram adquiridos de Pierce.

Métodos - Como descrito anteriormente, é aqui descrito um mé-
todo para ativação de proteínas com grupos hidrazida catalisado por carbo-
diimida na presença de aminoácidos, mistura de aminoácidos, peptídeos e
misturas de peptídeos, e três métodos gerais para a conjugação de polissa-
10 carídeos e misturas de polissacarídeos a proteínas. Os polissacarídeos bac-
terianos usados para a conjugação à proteína por esses métodos incluem
polissacarídeos meningocócicos dos sorogrupos A, C, W135 e Y.

Ativação de proteína com grupos hidrazida catalisada por carbodiimida na
presença de aminoácidos, mistura de aminoácidos, peptídeos e misturas de
15 peptídeos

1. Proteína (toxóide tetânico ou TT, 4 mg/ml, medido pelo ensaio
de Lowry [26] ou pelo ensaio de BCA [35]) reagido com hidrazina a 0,36 M
ou diidrazida de ácido adípico (ADH) na presença de 12-72 mM de EDC,
MES a 0,2 M, pH 5-6,5 e 0-144 mM de aminoácidos ou mistura de aminoáci-
20 dos por 1-24 horas.

2. A mistura de reação foi neutralizada com NaOH a 1 N e diali-
sada contra NaCl a 30 mM, HEPES a 10 mM, pH 7,5, 4°C.

3. Após diálise, as amostras foram registradas quanto à forma-
ção de precipitado.

25 4. As amostras foram armazenadas a 4°C por 1-8 semanas, a
formação de precipitado foi examinada e registrada.

5. As amostras que exibem pouco ou nenhum precipitado foram
analisadas por HPLC com uma coluna Superose 6.

6. A concentração de proteína é determinada por ensaio de BCA
30 [35], e a concentração de hidrazida é determinada por ensaio de TNBS [34].
O número de grupos hidrazida por molécula de TT, ou seja, o grau de ativa-
ção (DA), é calculado.

Método geral A para conjugação - PS ou mistura de PS ativada por aldeído que reagem com proteína ativada por hidrazida (conjugação por aminação redutiva)

1. Foram usados dois métodos para ativar o toxóide tetânico. O
5 toxóide tetânico foi ativado com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico na presença de EDC em pH 5,5-6,5, e depois foi feita a troca do tampão com NaCl 30 mM, Na_2CO_3 a 3 mM, pH em torno de 10,5. Alternativamente, o toxóide tetânico foi ativado com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico na presença de EDC em pH 5,5 e 0-144 mM de aminoácidos ou mistura de a-
10 minoácido, e depois foi feita a troca do tampão com NaCl a 30 mM, HEPES a 10 mM, pH 7,5, 4°C.

2. O polissacarídeo ou uma mistura de polissacarídeos (em uma proporção de peso desejada dos polissacarídeos componentes) foi ativado com NaIO_4 , e foi feita a troca do tampão com HEPES a 10 mM, pH 7,5, 4°C.

15 3. TT ativado por hidrazida foi reagido com polissacarídeo ou mistura de polissacarídeo ativada por aldeído em proporções de 2:1 a 1:2 e uma faixa de concentração de 1-40 mg/ml de um dia para o outro, pH 6,5-7,5, 4-40°C.

4. NaBH_4 (dez vezes os moles dos grupos aldeído no reagente
20 inicial) foi então adicionado por 6 horas até de um dia para o outro para reduzir a ligação dupla $\text{C}=\text{N}$ em ligação simples $\text{C}-\text{N}$, e também reduzir os grupos aldeído não reagidos em álcool.

5. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, com o uso de uma membrana com valor de
25 corte do peso molecular de 12-14 KDa.

6. O volume da amostra foi determinado.

7. A concentração de proteína foi calculada com base na quantidade de partida inicial medida pelo ensaio de Lowry [26] ou pelo ensaio de BCA [35].

30 8. A concentração de polissacarídeo foi calculada com base na quantidade de partida inicial medida por métodos de ensaio apropriados para cada polissacarídeo componente, antes da mistura, por exemplo, pelo

ensaio de resorcinol [27] para PSs de Mn A e C, pelo ensaio de antrona [32] para PSs de Mn W135 e Y, pelo ensaio de fósforo [33] para PS de Mn A, e pelo ensaio de Purpald [31] para PSs de Mn W135 e Y.

Método geral B para conjugação - PS ou mistura de PS ativada por cianato

5 que reagem com proteína ativada por hidrazida (conjugação por cianilação)

1. Foram usados dois métodos para ativar o toxóide tetânico. O toxóide tetânico foi ativado com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico na presença de EDC em pH 5,5-6,5, e depois foi feita a troca do tampão com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5. Alternativamente, toxóide tetânico foi ativado com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico na
10 presença de EDC em pH 5,5 e 0-144 mM de aminoácidos ou mistura de aminoácidos, e depois foi feita a troca do tampão com NaCl a 30 mM, HEPES a 10 mM, pH 7,5, 4°C.

2. O polissacarídeo ou uma mistura de polissacarídeos (em uma
15 proporção de peso desejada dos polissacarídeos componentes) foi ativado com CDAP por 2-2,5 minutos a 20-24°C na presença de trietilamina.

3. A 4°C, TT ativado por hidrazida foi reagido com polissacarídeo ou mistura de polissacarídeos ativada por cianato em proporções de 2:1 a 1:2 e uma faixa de concentração de 0,2-1 mg/ml, pH 6,5-7,5.

20 4. Após reação por 3 dias inteiros a 4°C (a incubação prolongada é para assegurar a decomposição dos grupos cianato não reagidos residuais que sobraram), a solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.

25 5. O volume da amostra foi determinado.

6. A concentração de proteína foi calculada com base na quantidade de partida inicial medida pelo ensaio de Lowry [26] ou pelo ensaio de BCA [35].

30 7. A concentração de polissacarídeo foi calculada com base na quantidade de partida inicial medida por métodos de ensaio apropriados para cada polissacarídeo componente, antes da mistura, por exemplo, pelo ensaio de resorcinol [27] para PSs de Mn A e C, pelo ensaio de antrona [32]

para PSs de Mn W135 e Y, pelo ensaio de fósforo [33] para PS de Mn A, e pelo ensaio de Purpald [31] para PSs de Mn W135 e Y.

O tempo de conjugação para a reação do método B para preparar vacinas multivalentes conjugadas combinadas sintetizadas sem uso de um agente de bloqueio é de 3 dias inteiros a 4°C. Em função do alto rendimento da conjugação e da alta imunogenicidade do produto de conjugação, é necessário um processo de purificação como, por exemplo, cromatografia em coluna e/ou precipitação com sulfato de amônio do conjugado do polissacarídeo não-conjugado.

10 Método geral C para conjugação - mistura de PS ou PS ativado por hidrazida que reagem com proteína ativada por aldeído (conjugação por aminação redutiva)

1. Foram usados dois métodos para ativar o toxóide tetânico. O toxóide tetânico foi reagido com 1-amino-2,3-propanodiol (APDO) na presença de EDC em pH 5,5-6,5, e depois o tampão foi trocado com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5, 4°C. TT-APDO foi reagido com NaIO₄ para criar grupos aldeído, e depois foi feita a troca do tampão com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5, 4°C. Alternativamente, o toxóide tetânico foi reagido com 1-amino-2,3-propanodiol (APDO) na presença de EDC em pH 5,5-6,5 e 0-144 mM de aminoácidos ou mistura de aminoácidos, e depois foi feita a troca do tampão com NaCl a 30 mM, HEPES a 10 mM, pH 7,5, 4°C. TT-APDO foi reagido com NaIO₄ para criar grupos aldeído, e depois foi feita a troca do tampão com NaCl a 30 mM, HEPES a 10 mM, pH 7,5, 4°C.

2. Foram usados três métodos para a preparação de polissacarídeo ou mistura de polissacarídeos ativada por hidrazida (em uma proporção de peso desejada dos polissacarídeos componentes): a) PS ou mistura de PS foi reagido com NaIO₄ e depois hidrazina ou diidrazida de ácido adípico com subsequente redução com NaBH₄ (aminação redutiva); b) PS ou mistura de PS foi ativado com CDAP e depois reagido com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico (reação de conjugação por cianilação); e c) PS ou mistura de PS foi reagido com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico na

presença EDC (reação de carbodiimida).

3. TT ativado por aldeído foi reagido com PS ou mistura de PSs ativada por hidrazida em proporções de 2:1 a 1:2 e uma faixa de concentração de 1-5 mg/ml por 18 horas, pH 6,5-7,5, 4-40°C.

5 4. NaBH_4 (dez vezes os moles do aldeído no reagente inicial) foi então adicionado por 6 horas, de um dia para o outro, para reduzir a ligação dupla $\text{C}=\text{N}$ em ligação simples $\text{C}-\text{N}$, e também reduzir os grupos aldeído não reagidos em álcool.

5. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.

6. O volume da amostra foi determinado.

7. A concentração de proteína foi calculada com base na quantidade de partida inicial medida pelo ensaio de Lowry [26] ou pelo ensaio de BCA [35].

8. A concentração de polissacarídeo foi calculada com base na quantidade de partida inicial medida por métodos de ensaio apropriados para cada polissacarídeo componente, antes da mistura, por exemplo, pelo ensaio de resorcinol [27] para de Mn A e C PSs, pelo ensaio de antrona [32] para Mn W135 e Y PSs, pelo ensaio de fósforo [33] para Mn A PS, e pelo ensaio de Purpald [31] para Mn W135 e Y PSs.

Ensaio físico-químico de proteína ativada e produtos conjugados

Cromatografia por exclusão de tamanho de alto rendimento (HPSEC)

Amostras de proteínas, polissacarídeos e produtos conjugados (25 μl , 0,05-1 mg/ml) foram processadas através de uma coluna Waters Ultrahidrogel 2000 ou Ultrahidrogel Linear ou de uma coluna Superose 6 com solução salina, Tris a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM a 0,5 ml/minuto em um sistema Dionex HPLC com o uso do software Chromelean e um detector de UV a 280 nm. O detector de UV a 280 nm monitora os sinais de espécies que contêm proteína, além de compostos que contêm porções aromáticas. O detector de RI mede os sinais de proteínas, polissacarídeos, conjugados e sais. Quando as vacinas multivalentes conjugadas combinadas sintetizadas

foram analisadas por HPLC, frações foram coletadas em cada minuto para detecção do conjugado de polissacarídeo-proteína por ELISA.

Método de ELISA para detecção de conjugado de PS-proteína

Placas Immunolon 1 (Dynatech) foram revestidas com 20 µl de cada fração de HPLC mais 80 µl de 1x PBS (um volume total de 100 µl de solução de revestimento) por 3 horas. Somente as espécies que contêm proteína (ou seja, proteína livre conjugada e não-conjugada) aderem à placa de poliestireno. Após lavagem três vezes com 150 µl de tampão de lavagem (PBS com Tween 20 0,05%, NaN_3 0,02%), 100 µl do respectivo anti-soro PS-específico (mas que não reage de forma cruzada com a proteína veículo) (1/100 - 1/250, diluído com tampão contendo PBS, 5% de soro de bezerro recém-nascido, NaN_3 0,02%) foram adicionados a cada cavidade. Após incubação de um dia para o outro, a placa foi lavada três vezes e incubada com 100 µl de Fc de IgG de cabra anticamundongo conjugado com fosfato alcalino (diluição de 1/10.000 em tampão de diluição) por três horas. Após lavagem (3 x 150 µl), as placas foram incubadas com 100 µl de fosfato de p-nitrofenila (1 mg/ml em Tris a 1 M, pH 9,8, MgCl_2 a 0,3 mM) por 30-180 minutos, e as leituras de ELISA a 405 nm foram medidas com uma leitora de placas. Após subtrair o valor fundo, a leitura representa o conjugado de PS em cada fração, uma vez que o PS livre não-conjugado não cola ou adere à placa durante o revestimento da placa. A presença de todas as espécies do polissacarídeo componente nas vacinas multivalentes conjugadas combinadas sintetizadas foi, dessa forma, demonstrada.

Imunogenicidade de conjugados de polissacarídeo-proteína em camundongos

Imunização de camundongos

A menos que especificado, camundongos (NIH-Swiss; grupos de 5 ou 10) foram imunizados com 1 µg/dose de cada polissacarídeo (em mistura de PS ou nos conjugados preparados pelos Métodos de conjugação A, B e C) nos dias 0, 14 e 28 com anti-soros coletados no 42º dia. ELISA foi realizado para determinação dos níveis de anticorpos contra os respectivos polissacarídeos nativos.

Método de ELISA para determinação de titulação de anticorpos

Placas Immunolon 1 (Dynatech) foram revestidas com 100 µl de solução de revestimento contendo polissacarídeo (5 µg/ml para Mn A, C, W135 ou Y) por 18 horas. Após lavagem três vezes com 150 µl de tampão de lavagem (PBS com Tween 20 0,05%, NaN_3 0,02%), 100 µl de amostras com especificidade de anti-soro e soro de referência (com 3.200 unidades/ml de anticorpo anti-polissacarídeo atribuídas arbitrariamente; duplicata) em uma diluição serial de duas vezes partindo de 1/200 (diluído com tampão de diluição contendo PBS, 4% de soro de bezerro recém-nascido, 0,02% de NaN_3 com 2 µg/ml de polissacarídeo da parede celular em casos pneumocócicos) foram adicionados a cada cavidade. Após incubação de um dia para o outro, as placas foram lavadas três vezes e incubadas com 100 µl de Fc de IgG de cabra anticamundongo conjugado com fosfato alcalino (diluição de 1/10.000 em tampão de diluição) por duas horas. Após lavagem (3 x 150 µl), as placas foram incubadas com 100 µl de fosfato de p-nitrofenila (1 mg/ml em Tris a 1 M, pH 9, MgCl_2 a 0,3 mM) por 30-45 minutos, e a reação foi interrompida com 50 µl de NaOH a 1 N. As leituras de ELISA foram medidas a 405 nm com uma leitora de placas, e os níveis de anticorpos antipolissacarídeo das amostras de anti-soro foram calculados a partir de suas leituras de ELISA e da curva-padrão do soro de referência co-testado na mesma placa. A média geométrica do nível de anticorpo para cada grupo de camundongos foi calculada.

Ensaio bactericida para determinação da funcionalidade biológica de anticorpo (titulação bactericida)

A função biológica do anticorpo induzido foi determinada por ensaio bactericida dos anti-soros induzidos contra a cepa bacteriana homóloga de acordo com o método em [Maslanka S.E., Gheesling L.L., Libutti D.E., Donaldson K.B., Harakeh H.S., Dykes J.K. *et al.* "Standardization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. The Multilaboratory Study Group". *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4(2): 156-167] com pequenas modificações. Resumidamente, as bactérias foram inicialmente cultivadas de um dia para o outro em uma

- placa com infusão cérebro-coração (BHI)/soro normal de cavalo 5% (NHS), e depois transferidas para uma placa fresca e cultivadas por 4-5 horas. Foi preparada uma suspensão bacteriana com 80% de transmitância a 530 nm em DPBS a partir da cultura fresca de 4-5 horas, e ela foi diluída até 50-80 unidades formadoras de colônia (CFU)/25 µl com DPBS (diluição de aproximadamente 1:50.000). O complemento foi descongelado em temperatura ambiente, enquanto se preparava a diluição bacteriana, e ela foi armazenada em gelo até ser usada. Em uma placa de cultura de tecido de 96 cavidades, uma série de diluições de duas vezes de amostras de teste e de controle foi feita com DPBS contendo $MgCl_2$ a 0,5 mM e $CaCl_2$ a 0,9 mM. Foram adicionados 25 µl de suspensão bacteriana a cada cavidade, seguidos por 25 µl de complemento (Lote Nº 34426-A, Pel-Freez, Rogers, Aarkansas). Após incubação a 37°C por 30 minutos sem CO_2 , 10 µl de suspensão bacteriana de cada cavidade foram plaqueados. As colônias foram contadas após incubação de um dia para o outro a 37°C com CO_2 5%. A titulação bactericida é a maior diluição da amostra de teste que gera uma redução de 50% em CFU, quando comparado com a cavidade de controle contendo complemento sem anti-soro.

EXEMPLOS ESPECÍFICOS

- 20 Ativação de proteína com hidrazina ou hidrazida catalisada por carbodiimida sob condições controladas que incluem o tempo de reação, a concentração de EDC e a concentração de aminoácidos e da mistura de aminoácidos

- Foi relatado que a reação de proteína com hidrazina ou diidrazida catalisada por EDC tende a causar agregação e precipitação do produto. Foram exploradas várias condições de reação para a reação de 4 mg/ml de TT com hidrazina a 0,36 M ou ADH a fim de obter o produto de reação sem precipitação.

Reação de ativação na ausência de aminoácido

- Na ausência de aminoácido, a reação foi realizada na presença de EDC a 12-48 mM por 1-24 horas. A mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, HEPES a 10 mM, pH 7,5, e foi armazenada a 4°C. Alguns produtos dessas reações formaram precipitado durante a reação ou

após armazenamento do produto dialisado a 4°C por 1-8 semanas. O grau de ativação (DA; número de grupos hidrazida por molécula de TT) das amostras restantes foi determinado e listado na Tabela 3. Os perfis de HPLC de alguns desses produtos são mostrados na Figura 1.

- 5 Tabela 3. Grau de ativação (DA; número de grupos hidrazida por molécula de TT) para toxóide tetânico ativado resultado de várias condições de ativação na ausência de aminoácido.

[EDC] (mM)	Tempo de reação para hidrazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
	1	2	4	24	1	2	4	24
12	- ^a	-	-	(92) ^b	49	-	-	-
18	-	(110)	(81)	(99)				
24	-	(83)	(90)	(107)	-	-	-	-
36	(77)	(96)	(102)	(112)	-	-	75	66
48	-	-	-	-	-	76	77	(103)

a. DA não é determinado para amostra que exibe precipitado.

- b. O número entre parênteses é o valor do DA da amostra sem precipitação, mas que apresenta redução substancial do sinal de proteína no perfil de H-PLC (Figura 1, Perfis A e B).

Reação de ativação na presença de lisina, arginina, histidina, glicina, serina, treonina e mistura de aminoácidos de lisina, arginina, histidina, glicina, serina, treonina, ácido glutâmico e cisteína

- 15 A reação do toxóide tetânico (4 mg/ml) com hidrazina a 0,36 M e ADH catalisada por EDC a 12 e 24 mM na presença de 36, 72 e 144 mM de aminoácido lisina, arginina, treonina, serina, glicina, histidina ou uma mistura de aminoácidos composta de molaridade igual de lisina, arginina, treonina, serina, glicina, histidina, ácido glutâmico e cisteína foi realizada por 1, 2, 4 e
- 20 24 horas. O grau de ativação (DA) dos produtos da reação sem precipitação foi determinado e listado na Tabela 4. Os perfis de HPLC de alguns desses produtos são mostrados na Figura 2.

Tabela 4. Grau de ativação (Da; número de grupos hidrazida por molécula de TT) para toxóide tetânico ativado resultado de várias condições de ativação na presença de aminoácido lisina, arginina, treonina, serina, glicina, histidina ou mistura de aminoácidos.

[EDC] (mM)	[Lys] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
12	36	- ^a	-	-	-	47	-	-	-
	72	-	-	-	-	39	40	57	-
	144	32	-	-	-	34	43	43	58
24	36	-	(95) ^b	(88)	(93)	-	-	(92)	(90)
	72	-	-	(103)	(106)	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-
[EDC] (mM)	[Arg] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
12	36	-	-	-	-	48	-	-	-
	72	-	-	-	-	40	46	56	-
	144	36	-	-	-	36	42	48	57
24	36	-	(86)	(83)	(92)	-	-	(87)	(93)
	72	-	-	(105)	(101)	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-
[EDC] (mM)	[Thr] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
12	36	-	-	-	-	47	-	-	-
	72	-	-	-	-	38	46	52	-
	144	35	-	-	-	32	42	46	48
24	36	-	(112)	(88)	(96)	-	-	(87)	(88)
	72	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-

[EDC] (mM)	[Ser] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
12	36	-	-	-	-	47	-	-	-
	72	32	-	-	-	39	43	51	57
	144	35	-	-	-	41	40	44	47
24	36	-	(114)	(82)	(91)	-	-	(91)	(93)
	72	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-
[EDC] (mM)	[Gly] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
12	36	-	-	-	-	49	-	-	-
	72	35	-	-	-	37	45	47	54
	144	32	32	32	33	35	40	39	47
24	36	-	-	-	-	-	-	-	(82)
	72	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-
[EDC] (mM)	[His] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
12	36	41	-	-	-	44	46	58	-
	72	28	36	46	-	27	35	41	46
	144	21	27	30	39	24	30	33	40
24	36	-	(85)	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	22	-	-	-
	144	65	-	48	-	40	44	58	-

[EDC] (mM)	[Mis] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
12	36	40	-	-	-	45	51	62	-
	72	12	12	13	17	19	17	18	22
	144	10	8	9	13	13	13	14	17
24	36	-	-	-	-	48	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	26	29	27	-	50	58	64	80

a. DA não é determinado para amostra que exhibe precipitado.

b. O número entre parênteses é o valor do DA da amostra sem precipitação, mas que apresenta redução substancial do sinal de proteína no perfil de H-PLC (Figura 2, Perfil A).

5

Reação de ativação na presença de ácido glutâmico (e ácido aspártico)

A reação do toxóide tetânico (4 mg/ml) com hidrazina a 0,36 M e ADH catalisada por EDC a 12, 24, 48 e 72 mM na presença de 36, 72 e 144 mM de ácido glutâmico foi realizada por 1, 2, 4 e 24 horas. O grau de ativação (DA) dos produtos da reação sem precipitação foi determinado e listado na Tabela 5. Os perfis de HPLC de alguns desses produtos são mostrados na Figura 3.

10

Tabela 5. Grau de ativação (DA; número de grupos hidrazida por molécula de TT) para toxóide tetânico ativado resultado de várias condições de ativação na presença de ácido glutâmico.

15

[EDC] (mM)	[Glu] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
12	36	19	21	26	27	35	35	35	39
	72	16	7	6	8	21	21	20	25
	144	5	5	12	15	16	17	18	21
24	36	33	35	- ^a	-	41	37	39	41
	72	23	23	25	30	36	37	36	41
	144	17	20	16	23	30	29	33	34
48	36	-	-	-	-	-	-	-	-

[EDC] (mM)	[Glu] (mM)	Tempo de reação para hi- drazina (horas)				Tempo de reação para ADH (horas)			
		1	2	4	24	1	2	4	24
	72	49	-	-	-	-	54	49	59
	144	25	26	27	33	38	39	40	44
72	36	-	(98) ^b	(80)	(92)	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	34	35	37	-	46	46	46	53

a. DA não é determinado para amostra que exibe precipitado.

b. O número entre parênteses é o valor do DA da amostra sem precipitação, mas que apresenta redução substancial do sinal de proteína no perfil de H-PLC.

5 Conjugação de misturas de polissacarídeos a proteínas

Método A [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos γ -toxóide tetânico] lote ACWY040228a1

Ativação de TT para conter grupos hidrazida

10 1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com hidrazina a 0,42 M na presença de EDC a 20 mM, MES a 0,1 M, pH 6,5 a 20-24°C.

2. Após reação por 4 horas, o pH da mistura de reação foi elevado até 7,5-10 com NaOH a 1 N para interromper a reação.

15 3. A mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

Ativação da mistura de PSs de Mn A, C, W135 e Y para conter grupos aldeído

20 1. A mistura de PSs de Mn A, C, W135 e Y (10 mg/ml, PS total; 2,5 mg/ml, cada PS componente) foi reagida com 6 mM de NaIO₄ a 20-24°C por 4 horas.

2. A amostra foi dialisada contra HEPES a 10 mM, pH 7,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

Conjugação de mistura de PS ativado de Mn A, C, W135 e Y ao TT ativado

25 1. Alíquota de TT contendo hidrazida (0,4 mg) foi ajustada até 10

mg/ml por liofilização e dissolução em 0,04 ml de água.

2. Alíquota de mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y contendo aldeído foi ajustada até 10 mg/ml por liofilização e dissolução em 0,04 ml de HEPES a 0,2 M pH 7,5, EDTA a 30 mM.

5 3. Adicionada a solução de TT ativado a um volume igual da mistura de PS ativado de Mn e turbilhonada.

4. Incubada a mistura de reação a 20-24°C de um dia para o outro.

10 5. A mistura de reação foi tratada com 6 µl de NaBH₄ a 1 M (10 vezes o equivalente molar em relação à concentração inicial de aldeído no PS ativado) por 6 horas.

6. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, 4°C, com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.

15 7. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y) foram calculadas a partir das massas inseridas.

Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote ACWY040228a1

20 A Figura 4 mostra o perfil de eluição por HPSEC (monitorado a 280 nm) do conjugado lote ACWY040228a1. A mudança do sinal de proteína de 17,5 para 13 minutos foi observada com a conjugação, e pouca proteína livre não-conjugada restava após conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo meningocócico A, C, W135 ou Y em cada fração do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos para cada polissacarídeo (Figura 5).

Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote ACWY040228a1

30 O conjugado foi usado para imunizar grupos de 10 camundongos com polissacarídeo nativo como controle a 1 µg de polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ELISA

- são: Mn A, 11 (1, 195; 1 intervalo de confiança SD), MnC, 672 (328, 1.379); Mn W135, 72 (32, 162); e Mn Y, 298 (105, 844) para o grupo de controle, e Mn A, 9.291 (3.535, 24.421), Mn C, 4.080 (1.694, 9.824); Mn W135, 17.450 (9.502, 32.050); e Mn Y, 114.429 (60.462, 216.566) para as bateladas de conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS de sorogrupo (Tabela 6). Os conjugados induziram 6-845 vezes mais anticorpo anti-PS de Mn específico em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo. As médias geométricas da titulação bactericida induzida duas semanas após a 3ª injeção determinadas por
- ensaio bactericida são: Mn A, 329 (113, 598; 1 intervalo de confiança SD), MnC, 329 (163, 668); Mn W135, 2.743 (1.851, 4.066); e Mn Y, 12.958 (10.197, 16.559) para o grupo de controle, e Mn A, 9.699 (3.373, 27.895), Mn C, 1.657 (854, 3.214); Mn W135, 6.625 (2.076, 21.143); e Mn Y, 77.262 (32.824, 181.863) para a batelada de conjugado (Tabela 6b). Os conjugados induziram 2,4-29 vezes mais titulação bactericida em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

Tabela 6a. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (10 camundongos por grupo) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PS de Mn no conjugado multivalente lote ACWY040228a1

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote ACWY040228a1	Aumento (vezes)
A	11 (1, 195)	92,91 (3.535, 24.421)	845
C	672 (328, 1.379)	4.080 (1.694, 9.824)	6
W135	72 (32, 162)	17.450 (9.502, 32.050)	242
Y	298 (105, 844)	114.429 (60.462, 216.566)	384

a. Comparado com um soro de referência de cada PS com um nível de anticorpo anti-PS de Mn presumido de 3200 unidades/ml

Tabela 6b. A média geométrica da titulação bactericida com 1 de intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (10 camundongos por grupo) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PSs de Mn no conjugado multivalente lote ACWY040228a1

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote ACWY040228a1	Aumento (vezes)
A	329 (113, 958)	9.699 (3.373, 27.895)	29
C	329 (163, 668)	1.657 (854, 3.214)	5
W135	2.743 (1.851, 4.066)	6.625 (2.076, 21.143)	2,4
Y	12.995 (10.197, 16.559)	77.262 (32.824, 181.863)	6

Método B [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos γ -toxóide tetânico] lote ACWY040723B5

Ativação de TT para conter grupos hidrazida

- 5 1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com hidrazina a 0,42 M na presença de EDC a 20 mM, MES a 0,1 M, pH 6,5 a 20-24°C.
2. Após reação por 4 horas, o pH da mistura de reação foi elevado até 7,5-10 com NaOH a 1 N para interromper a reação.
3. A mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.
- 10

Ativação da mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y para conter grupos cianato

1. Mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y (0,04 ml, 10 mg/ml, PS total; 2,5 mg/ml, cada PS componente) foi ativada com 5 μ l CDAP (100 mg/ml em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24°C na presença de 5 μ l trietilamina a 0,2 M.
- 15
2. O polissacarídeo ativado foi misturado com 0,625 ml de HEPES a 0,2 M gelado, pH 7,5, EDTA a 30 mM, e usado imediatamente para conjugação.

20 Conjugação da mistura de PSs ativados de Mn A, C, W135 e Y ao TT ativado

1. O polissacarídeo ativado foi adicionado a 0,25 mg de TT ativado (gelado, 0,0065 ml, 3,84 mg/ml); vortex.
2. Incubada a mistura de reação a 4°C com agitação suave por 3 dias inteiros (a incubação prolongada é para assegurar a decomposição dos
- 25

grupos cianato residuais não reagidos que sobram).

3. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 Kda.

- 5 4. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y) foram calculadas a partir das massas inseridas.

Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote ACWY040723B5

- 10 A Figura 6 mostra os perfis de eluição por HPSEC (monitorados a 280 nm) do conjugado lote ACWY040723B5. A mudança do sinal de proteína de 17,5 para 14,5 minutos foi observada com a conjugação, e uma quantidade significativa de proteína livre não-conjugada foi deixada após a conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo meningocócico A, C,
15 W135 ou Y em cada fração do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos para cada polissacarídeo (Figura 7).

Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote ACWY040423B5

- 20 O conjugado foi usado para imunizar grupos de 10 camundongos com polissacarídeo nativo como controle a 1 µg de polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ELISA são: Mn A, 11 (1, 195; 1 intervalo de confiança SD), MnC, 672 (328, 1.379); Mn W135, 72 (32, 162); e Mn Y, 298 (105, 844) para o grupo de controle, e
25 Mn A, 5214 (2.532, 10.739), Mn C, 6.430 (1.797, 23.008); Mn W135, 8.211 (490, 137.609); e Mn Y, 81.833 (26.489, 252.808) para as bateladas de conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS de sorogrupo (Tabela 7). Os conjugados induziram 10-474 vezes mais anticorpo anti-PS de Mn específico em camundongos, quando comparados
30 com o controle de PS de Mn nativo. As médias geométricas da titulação bactericida induzida duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ensaio bactericida são: Mn A, 329 (113, 598; 1 intervalo de confiança SD), MnC,

- 329 (163, 668); Mn W135, 2743 (1.851, 4.066); e Mn Y, 12.958 (10.197, 16.559) para o grupo de controle, e Mn A, 1.255 (696, 2.263), Mn C, 3.203 (1.536, 6.679); Mn W135, 33.774 (9.346, 122.041); e Mn Y, 171.471 (93.450, 314.632) para a batelada de conjugado (Tabela 7b). Os conjugados induzi-
- 5 ram 4-13 vezes mais titulação bactericida em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

- Tabela 7a. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (10 camundongos por grupo) duas semanas após a 3^a imunização com 1 µg/dose de cada um dos PSs de Mn no conjugado multivalente lote ACWY040723B5
- 10

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote ACWY040723B5	Aumento em vezes
A	11 (1, 195)	5.214 (2.532, 10.739)	474
C	672 (328, 1.379)	6.430 (1.797, 23.008)	10
W135	72 (32, 162)	8.211 (490, 137.609)	114
Y	298 (105, 844)	81.833 (26.489, 252.808)	275

a. Comparado com um soro de referência de cada PS com um nível de anticorpo anti-PS de Mn presumido de 3.200 unidades/ml.

- Tabela 7b. A média geométrica da titulação bactericida com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (10 camundongos por grupo) duas semanas após a 3^a imunização com 1 µg/dose de cada um dos PS de Mn no conjugado multivalente lote ACWY040723B5
- 15

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote ACWY040723B5	Aumento em vezes
A	329 (113, 958)	1.255 (696, 2263)	4
C	329 (163, 668)	3.203 (1536, 6679)	10
W135	2743 (1.851, 4066)	33.774 (9.346, 122.041)	12
Y	12.995 (10.197, 16.559)	171.471 (93.450, 314.632)	13

Método C – [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos y-toxóide tetânico] lote ACWY040723C5

Ativação de TT para conter grupos aldeído

1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com 1-amino-2,3-propanodiol a 0,42 M (APDO) na presença de EDC a 20 mM, MES a 0,1 M, pH 6,5 a 20-24°C.

5 2. Após reação por 4 horas, o pH da mistura de reação foi elevado até 7,5-10 com NaOH a 1 N para interromper a reação.

3. A mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

10 4. O grau de TT modificação com APDO foi determinado pelo ensaio de Purpald [31] e pelo ensaio de Lowry [26].

5. Alíquota de TT-APDO foi reagida com NaIO₄ a 6 mM por 3 horas, e depois foi feita a troca do tampão com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5.

15 Ativação da mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y para conter grupos hidrazida

1. Mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y (0,04 ml, 10 mg/ml, PS total; 2,5 mg/ml, cada PS componente) foi ativada com 5 µl CDAP (100 mg/ml em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24°C na presença de 5 µl trietilamina a 0,2 M.

20

2. Ao final da ativação, 0,01 ml de hidrazina a 5 M, pH 7, foi adicionado e misturado.

3. A mistura de reação foi incubada por 4 horas a 20-24°C.

25 4. A amostra foi dialisada contra HEPES a 10 mM, pH 7,5 a 4°C, com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

5. O volume da mistura de PS ativado foi determinado (0,12 ml).

Conjugação da mistura de PS ativado de Mn A, C, W135 e Y ao TT ativado

1. A mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y contendo hidrazida (0,5 mg em 0,12 ml) foi misturada com 0,03 ml de HEPES a 1 M, pH 7,5.

30 2. Uma alíquota de TT contendo aldeído (0,5 mg; 0,148 ml 3,38 mg/ml) foi adicionada à mistura de PS ativado de Mn A, C, W135 e Y (volume total, 0,298 ml).

3. Incubar a mistura de reação a 20-24°C por 18 horas.

4. A mistura de reação foi tratada com 5 µl de NaBH₄ a 1 M por 6 horas.

5. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.

6. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y) foram calculadas a partir das massas inseridas.

10 Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote ACWY040723C5

A Figura 8 mostra os perfis de eluição por HPSEC (monitorados a 280 nm) do conjugado lote ACWY040723C5. A mudança do sinal de proteína de 17,5 para 14 minutos foi observada com a conjugação, e proteína livre não-conjugada residual restava após a conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo meningocócico A, C, W135 ou Y em cada fração do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos para cada polissacarídeo (Figura 9).

20 Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote ACWY040423C5

O conjugado foi usado para imunizar grupos de 10 camundongos com polissacarídeo nativo como controle a 1 µg de polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ELISA são: Mn A, 11 (1, 195; 1 intervalo de confiança SD), MnC, 672 (328, 1.379); Mn W135, 72 (32, 162); e Mn Y, 298 (105, 844) para o grupo de controle, e Mn A, 17.250 (6.786, 43.847), Mn C, 11.035 (5.996, 20.309); Mn W135, 8.321 (3.505, 19.755); e Mn Y, 84.643 (46.669, 153.517) para as bateladas de conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS de sorogrupo (Tabela 8). Os conjugados induziram 16-1.568 vezes mais anticorpo anti-PS de Mn específico em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo. As médias geométricas da

- titulação bactericida induzida duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ensaio bactericida são: Mn A, 329 (113, 598; 1 intervalo de confiança SD), MnC, 329 (163, 668); Mn W135, 2.743 (1.851, 4.066); e Mn Y, 12.958 (10.197, 16.559) para o grupo de controle, e Mn A, 3.941 (921, 16.862), Mn C, 6.860 (2.812, 16.733); Mn W135, 72.403 (39.288, 133.431); e Mn Y, 82.832 (43.591, 157.400) para a batelada de conjugado (Tabela 8b). Os conjugados induziram 6-26 vezes mais titulação bactericida em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

- 10 Tabela 8a. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (10 camundongos por grupo) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PS de Mn no conjugado multivalente lote ACWY040723C5

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote ACWY040723C5	Aumento em vezes
A	11 (1, 195)	17.250 (6.786, 43.847)	1.568
C	672 (328, 1.379)	11.035 (5.996, 20.309)	16
W135	72 (32, 162)	8.321 (3505, 19.755)	116
Y	298 (105, 844)	84.643 (46.669, 153.517)	284

- a. Comparado com um soro de referência de cada PS com um nível de anti-corpo anti-PS de Mn presumido de 3.200 unidades/ml.

- 15 Tabela 8b. A média geométrica da titulação bactericida com 1 DP de intervalo de confiança de grupos de camundongos (10 camundongos por grupo) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PS de Mn no conjugado multivalente lote ACWY040723C5

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote ACWY040723C5	Aumento em vezes
A	329 (113, 958)	3.941 (921, 16.862)	12
C	329 (163, 668)	6.860 (2.812, 16.733)	21
W135	2.743 (1.851, 4.066)	72.403 (39.288, 133.431)	26
Y	12.995 (10.197, 16.559)	82.832 (43.591, 157.400)	6

Método A – [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos γ -toxóide tetânico] lote MnACWYTTD(K72)050131A6

Ativação de TT para conter grupos hidrazida

- 5 1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com diidrazida de ácido adípico a 0,36 M na presença de lisina a 72 mM, EDC a 12 mM, MES a 0,1 M, pH 5,5 a 20-24°C.
2. Após reação por 2 horas, a mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, HEPES a 10 mM, pH em torno de 7,5 a 4°C
- 10 com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.
3. O volume da amostra foi determinado, e a concentração do TT ativado foi calculada (3,48 mg/ml).

Ativação da mistura de PSs de Mn A, C, W135 e Y para conter grupos aldeído

- 15 1. A mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y (10 mg/ml, PS total; 2,5 mg/ml, cada PS componente) foi reagida com NaIO₄ a 6 mM a 4°C de um dia para o outro.
2. A amostra foi dialisada contra HEPES a 10 mM, pH 7,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.
- 20 3. O volume da amostra foi determinado, e a concentração da mistura de PS ativado foi calculada (7,25 mg/ml de PS total).

Conjugação da mistura de PS ativados de Mn A, C, W135 e Y ao TT ativado

1. Uma alíquota de mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y contendo aldeído (1 mg; 0,138 ml, 7,25 mg/ml) foi adicionada a 0,0284 ml de
- 25 HEPES a 1 M, pH 7,5 e 0,0189 ml de EDTA a 0,5 M.
2. A mistura foi mantida no gelo.
3. A alíquota de TT contendo hidrazida (1 mg; 0,288 ml, 3,475 mg/ml) foi adicionada à mistura de PS ativado em gelo e misturada.
4. Incubada a mistura de reação a 4°C de um dia para o outro.
- 30 5. A mistura de reação foi tratada com 10 μ l de NaBH₄ a 1 M por 6 horas.
6. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a

10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, 4°C com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.

7. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y) foram calculadas a partir das massas inseridas.

Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote MnACWYTTD(K72)050131A6

- A Figura 10 mostra o perfil de eluição por HPSEC (monitorado a 280 nm) do conjugado lote MnACWYTTD(K72)050131A6. A mudança do sinal de proteína de 17,5 para 13 minutos foi observada com a conjugação, e pouca proteína livre não-conjugada restava após conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo meningocócico A, C, W135 ou Y em cada fração do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos para cada polissacarídeo (Figura 11).

- Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote MnACWYTTD(K72)050131A6

- O conjugado foi usado para imunizar um grupo de 5 camundongos com uma mistura de polissacarídeo nativo (10 camundongos) como um controle, a 1 µg de cada polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ELISA são: Mn A, 11 (1, 195; 1 intervalo de confiança SD); MnC, 672 (328, 1.379); Mn W135, 72 (32, 162); e Mn Y, 298 (105, 844) para o grupo de controle, e Mn A, 8.308 (5.282, 13.071); Mn C, 4.090 (1.424, 11.746); Mn W135, 11.314 (5.981, 21.403); e Mn Y, 90.779 (63.135, 130.528) para o conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS (Tabela 9). Os conjugados induziram 6-305 vezes mais anticorpo anti-PS de Mn específico em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

- Tabela 9. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (10 camundongos para controle de mistura de PSs nativos e 5 camundongos para o experimento) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos

PS de Mn no conjugado multivalente lote MnACWYTTD(K72)050131A6.

Polissacárido	Mistura de PS nativo	Lote MnACWYTTD(K72)050131A6	Aumento em vezes
A	11 (1, 195)	8.308 (5282, 13.071)	755
C	672 (328, 1.379)	4.090 (1.424, 11.746)	6
W135	72 (32, 162)	11.314 (5.981, 21.403)	157
Y	298 (105, 844)	90.779 (63.135, 130.528)	305

Método B – [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos γ -toxóide tetânico] lote MnACWYTTD(K72)050201B6

5 Ativação de TT para conter grupos hidrazida

1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com diidrazida de ácido adípico a 0,36 M na presença de lisina a 72 mM, EDC a 12 mM, MES a 0,1 M, pH 5,5 a 20-24°C.

2. Após reação por 2 horas, a mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, HEPES a 10 mM, pH em torno de 7,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

3. O volume da amostra foi determinado, e a concentração do TT ativado foi calculada (3,48 mg/ml).

Ativação da mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y para conter grupos cianato

15 1. Mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y (0,1 ml, 10 mg/ml, PS total; 2,5 mg/ml, cada PS componente) foi ativada com 6 μ l de CDAP (100 mg/ml em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24°C na presença de 6 μ l trietilamina a 0,2 M.

20 2. O polissacarídeo ativado foi misturado com 1,25 ml de HEPES gelado a 0,2 M, pH 7,5, EDTA a 30 mM, e usado imediatamente para conjugação.

Conjugação da mistura de PS ativados de Mn A, C, W135 e Y ao TT ativado

1. O polissacarídeo ativado foi adicionado a 0,5 mg TT ativado (gelado, 0,144 ml, 3,48 mg/ml); vortex.

25 2. Incubada a mistura de reação a 4°C com agitação suave por 3 dias inteiros (a incubação prolongada é para assegurar a decomposição dos

grupos cianato residuais não reagidos que sobram).

3. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.

5 4. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y) foram calculadas a partir das massas inseridas.

Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote MnACWYTTD(K72)050201B6

10 A Figura 12 mostra os perfis de eluição por HPSEC (monitorados a 280 nm) do conjugado lote MnACWYTTD(K72)050201B6. A mudança do sinal de proteína de 17,5 para 14 e 16 minutos foi observada com a conjugação, e uma quantidade substancial de proteína livre não-conjugada restava após a conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo
15 meningocócico A, C, W135 ou Y em cada fração do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos para cada polissacarídeo (Figura 13).

Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote MnACWYTTD(K72)050201B6

20 O conjugado foi usado para imunizar um grupo de 5 camundongos com polissacarídeo nativo como controle (10 camundongos) a 1 µg de cada polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ELISA são: Mn A, 11 (1, 195; 1 intervalo de confiança
25 SD); MnC, 672 (328, 1.379); Mn W135, 72 (32, 162); e Mn Y, 298 (105, 844) para o controle, e Mn A, 2.752 (1.355, 5.589); Mn C, 2.930 (1.190, 7.212); Mn W135, 4.755 (1.455, 15.542); e Mn Y, 22.494 (10.466, 48.347) para o grupo de conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS (Tabela 10). Os conjugados induziram 4-250 vezes mais
30 anticorpo anti-PS de Mn específico em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

Tabela 10. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com

1 DP de intervalo de confiança de grupos de camundongos (10 camundongos para controle de mistura de PSs nativos e 5 camundongos para o experimento) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PSs de Mn no conjugado multivalente lote

5 MnACWYTTD(K72)050201B6.

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote MnACWYTTD(K72)050201B6	Aumento em vezes
A	11 (1, 195)	2.752 (1.355, 5.589)	250
C	672 (328, 1379)	2.930 (1.190, 7.212)	4
W135	72 (32, 162)	4.755 (1.455, 15.542)	66
Y	298 (105, 844)	22.494 (10.466, 48.347)	75

a. Comparado com um soro de referência de cada PS com um nível de anti-corpo anti-PS de Mn presumido de 3.200 unidades/ml.

Método A – [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos γ-toxóide tetânico] lote

10 TTHACWY061126

Ativação de TT para conter grupos hidrazida

1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com hidrazina a 0,42 M na presença de EDC a 20 mM, MES a 0,1 M, pH 5,5 a 20-24°C.

2. Após reação por 4 horas, o pH da mistura de reação foi elevado até 7,5-10 com NaOH a 1 N para interromper a reação.

3. A mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

Ativação de PS individual de Mn A, C, W135 e Y por NaIO₄ para conter grupos aldeído

1. PS de Mn A (10 mg/ml) foi ativado com 15 mM de NaIO₄ a 4°C por 72 horas, extinto com 25 mM de glicerol e dialisado contra H₂O a 4°C.

2. PS de Mn C (10 mg/ml) foi ativado com NaIO₄ a 6 mM em temperatura ambiente por 4 horas, extinto com glicerol a 25 mM e dialisado contra H₂O a 4°C.

3. PS de Mn W135 (10 mg/ml) foi ativado com NaIO₄ a 3 mM a

4°C de um dia para o outro, extinto com glicerol a 25 mM e dialisado contra H₂O a 4°C.

4. PS de Mn Y (10 mg/ml) foi ativado com NaIO₄ a 3 mM a 4°C de um dia para o outro, extinto com glicerol a 25 mM e dialisado contra H₂O a 4°C.

Conjugação da mistura de PS ativados de Mn A, C, W135 e Y ao TT ativado

1. Alíquota de PS ativado de Mn A, C, W135 e Y contendo aldeído foi misturada em uma proporção de 1:1:1:1 (P/P; PS total = 0,1 mg).
2. A mistura de PSs foi mantida no gelo e misturada com 1 µl de MES a 1 M, pH 6.
3. O volume total do PS foi trazido até 36,8 µl com água gelada.
4. Uma alíquota de TT contendo hidrazida (0,1 mg; 29,9 µl, 3,41 mg/ml) foi adicionada à mistura de PS ativado em gelo e misturada.
5. Incubada a mistura de reação a 4°C por dois dias inteiros.
6. Adicionado 1 µl MES a 1 M, pH 6,5.
7. A mistura de reação foi tratada com 2 µl de NaBH₄ a 1 M a 4°C de um dia para o outro.
8. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, 4°C com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.
9. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y) foram calculadas a partir das massas inseridas.

Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote T-

THACWY061126

O conjugado lote TTHACWY061126 foi analisado por perfis de eluição por HPSEC (monitorados a 280 nm). A mudança do sinal de proteína de 17,5 a 14 minutos foi observada com a conjugação, e pouca proteína livre não-conjugada restava após conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo meningocócico A, C, W135 ou Y em cada fração do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos para cada polissacarídeo (Figura 14).

Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote T-THACWY061126

O conjugado foi usado para imunizar um grupo de 15 camundongos com mistura de polissacarídeo nativo (5 camundongos) como controle a 1 µg de cada polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ELISA são: Mn A, 108 (39, 296; 1 DP de intervalo de confiança); Mn C, 416 (221, 784); Mn W135, 52 (29, 96); e Mn Y, 386 (232, 644) para o grupo de controle, e Mn A, 29.819 (18.049, 49.266); Mn C, 1.319 (372, 4.674); Mn W135, 11.075 (4.610, 26.607); e Mn Y, 39.901 (24.295, 65.530) para o conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS (Tabela 11a). Os conjugados induziram 3-268 vezes mais anticorpo anti-PS de Mn específico em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo. As médias geométricas da titulação bactericida induzida duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ensaio bactericida são: Mn A, 394 (114, 1.358; 1 intervalo de confiança SD), MnC, 226 (97, 529); Mn W135, 10.396 (6.146, 17.585); e Mn Y, 9.050 (9.050, 9.050) para o grupo de controle, e Mn A, 12125 (3.800, 38.689), Mn C, 1.811 (621, 5.282); Mn W135, 89.595 (28.643, 280.251); e Mn Y, 128.062 (25.097, 653.452) para a batelada de conjugado (Tabela 11b). Os conjugados induziram 8-31 vezes mais titulação bactericida em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

Tabela 11a. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com 1 DP de intervalo de confiança de grupos de camundongos (5 camundongos para controle de mistura de PS nativo e 15 camundongos para o experimento) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PSs de Mn no conjugado multivalente lote TTHACWY061126.

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote T-THACWY061126	Aumento em vezes
A	108 (39, 296)	29.819 (18.049, 49.266)	268
C	416 (221, 784)	1.319 (372, 4.674)	3
W135	52 (29, 96)	11.075 (4.610, 26.607)	213

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote T- THACWY061126	Aumento em vezes
Y	386 (232, 644)	39.901 (24.295, 65.530)	103

a. Comparado com um soro de referência de cada PS com um nível de anti-corpo anti-PS de Mn presumido de 3.200 unidades/ml.

5 Tabela 11b. A média geométrica da titulação bactericida com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (5 camundongos para controle de mistura de PS nativos e 15 camundongos para o experimento) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PS de Mn no conjugado multivalente lote TTHACWY061126.

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote TTHACWY061126	Aumento em vezes
A	394 (114, 1358)	12.125 (3.800, 38.689)	31
C	226 (97, 529)	1.811 (621, 5.282)	8
W135	10.396 (6.146, 17.585)	89.595 (28.643, 280.251)	9
Y	9.050 (9.050, 9.050)	128.062 (25.097, 653.452)	14

10 Método B – [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos γ-toxóide tetânico] lote TTHVIIACWYa060922B (2:2)

Ativação de TT para conter grupos hidrazida

1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com hidrazina a 0,42 M na presença de EDC a 30 mM, MES a 0,1 M, pH 5,5 a 20-24°C.
2. Após reação por 1 hora, o pH da mistura de reação foi elevado até 7,5-10 com NaOH a 1 N para interromper a reação.
3. A mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

Ativação da mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y para conter grupos cianato

- 20 A mistura de PS de Mn A, C, W135 e Y (1:1:1:1, P/P; 0,0125 ml, 10 mg/ml) foi ativada com 0,75 µl de CDAP (100 mg/ml em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24°C na presença de 0,5 µl de trietilamina a 0,2 M.

Conjugação da mistura de PS ativados de Mn A, C, W135 e Y ao TT ativado

1. O polissacarídeo ativado foi misturado com 50 µl de 2x PBS gelado, pH 7,4, seguido por adição de 0,125 mg de TTH (32,3 µl, 3,87 mg/ml, gelado).

5 2. Incubada a mistura de reação a 4°C com agitação suave por 3 dias inteiros (a incubação prolongada é para assegurar a conjugação completa, bem como a decomposição dos grupos cianato residual não reagidos que sobram).

3. A solução teve o tampão trocado a 4°C com solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.

4. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y) foram calculadas a partir das massas inseridas.

15 Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote TTHVI-IACWYa060922B(2:2)

O conjugado lote TTHVIACWYa060922B(2:2) foi analisado por perfis de eluição por HPSEC (monitorados a 280 nm). A mudança do sinal de proteína de 17,5 a 14 minutos foi observada com a conjugação, e pouca proteína livre não-conjugada restava após conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo meningocócico A, C, W135 ou Y em cada fração do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos para cada polissacarídeo.

25 Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote T-THVIACWYa060922B (2:2)

O conjugado foi usado para imunizar um grupo de 5 camundongos com polissacarídeo nativo como controle a 1 µg de cada polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ELISA são: Mn A, 108 (39, 296; 1 intervalo de confiança SD); MnC, 416 (221, 784); Mn W135, 52 (29, 96); e Mn Y, 386 (232, 644) para o controle, e Mn A, 24.828 (16.738, 36.829); Mn C, 10.641 (6.118, 18.506); Mn W135,

- 15.068 (7.374, 30.788); e Mn Y, 99.827 (56.810, 175.416) para o grupo de conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS (Tabela 12a). Os conjugados induziram 26-290 vezes mais anticorpo anti-PS de Mn específico em camundongos, quando comparados com o
- 5 controle de PS de Mn nativo. As médias geométricas da titulação bactericida induzida duas semanas após a 3ª injeção determinadas por ensaio bactericida são: Mn A, 394 (114, 1.358; 1 intervalo de confiança SD), MnC, 226 (97, 529); Mn W135, 10.396 (6.146, 17.585); e Mn Y, 9.050 (9.050, 9.050) para o grupo de controle, e Mn A, 5.970 (3.212, 11.099), Mn C, 19.400 (8.185,
- 10 45.985); Mn W135, 68.593 (19.473, 241.620); e Mn Y, 111.431 (45.134, 275.106) para a batelada de conjugado (Tabela 12b). Os conjugados induziram 7-86 vezes mais titulação bactericida em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

- 15 Tabela 12a. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (5 camundongos para controle de mistura de PS nativo e 5 camundongos para o experimento) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PSs de Mn no conjugado multivalente lote TTHVIIACWYa060922B(2:2).

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote TTHVIIACW-Ya060922B(2:2)	Aumento em vezes
A	108 (39, 296)	24.828 (16.738, 36.829)	230
C	416 (221, 784)	10.641 (6.118, 18.506)	26
W135	52 (29, 96)	15.068 (7.374, 30.788)	290
Y	386 (232, 644)	99.827 (56.810, 175.416)	259

- 20 a. Comparado com um soro de referência de cada PS com um nível de anticorpo anti-PS de Mn presumido de 3.200 unidades/ml.

Tabela 12b. A média geométrica da titulação bactericida com 1 DP de intervalo de confiança de grupos de camundongos (5 camundongos por grupo) duas semanas após a 3ª imunização com 1 µg/dose de cada um dos PSs de Mn no conjugado multivalente lote TTHVIIACWYa060922B(2:2).

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote <u>TTHVIIACW-</u> <u>Ya060922B(2:2)</u>	Aumento em vezes
A	394 (114, 1358)	5.971 (3.212, 11.099)	15
C	226 (97, 529)	19.499 (8.185, 45.985)	86
W135	10.396 (6.146, 17.585)	68.593 (19.473, 241.620)	7
Y	9.050 (9.050, 9.050)	111.431 (45.134, 275.106)	12

Método A – [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos γ -toxóide tetânico] lote TTH2C/AWY070209

5 Ativação de TT para conter grupos hidrazida

1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com hidrazina a 0,42 M na presença de EDC a 20 mM, MES a 0,1 M, pH 5,5 a 20-24°C.

2. Após reação por 4 horas, o pH da mistura de reação foi elevado até 7,5-10 com NaOH a 1 N para interromper a reação.

10 3. A mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

Ativação de PS individual de Mn A, C, W135 e Y por NaIO₄ para conter grupos aldeído

15 1. PS de Mn A (10 mg/ml) foi ativado com NaIO₄ a 15 mM a 4°C por 72 horas, extinto com glicerol a 25 mM e dialisado contra H₂O a 4°C.

2. PS de Mn C (10 mg/ml) foi ativado com 6 mM de NaIO₄ em temperatura ambiente por 4 horas, extinto com 25 mM de glicerol e dialisado contra H₂O a 4°C.

20 3. PS de Mn W135 (10 mg/ml) foi ativado com NaIO₄ a 3 mM a 4°C de um dia para o outro, extinto com 25 mM de glicerol e dialisado contra H₂O a 4°C.

25 4. PS de Mn Y (10 mg/ml) foi ativado com 3 mM de NaIO₄ a 4°C de um dia para o outro, extinto com 25 mM de glicerol e dialisado contra H₂O a 4°C.

Conjugação da mistura de PSs ativados de Mn A, C, W135 e Y ao TT ativado

1. Alíquota (0,1 mg) de PS de Mn C ativado foi liofilizada e redissolvida em 1 µl de 1 M de MES, pH 6.
- 5 2. Alíquota de TT contendo hidrazida (0,2 mg) foi liofilizada e redissolvida em 2 µl de H₂O.
3. Adicionar a solução de proteína à solução de PS de Mn C ativado a 4°C no 1º dia; misturar; e incubar de um dia para o outro a 4°C.
4. A 4°C, adicionar 0,05 mg de PS de Mn A ativado em 2-7 µl à
10 mistura de reação de TT contendo hidrazida/PS de Mn C ativado no 2º dia; misturar; e incubar de um dia para o outro a 4°C.
5. A 4°C, adicionar solução salina gelada e 0,05 mg de cada um dos PSs ativados de Mn W135 e Y à mistura de reação da etapa (4) no 3º dia até um volume total de 200 µl; misturar; e incubar de um dia para o outro
15 a 4°C.
6. Adicionar 2 µl de MES a 1 M, pH 6,5.
7. A mistura de reação foi tratada com 3 µl de NaBH₄ a 1 M a 4°C de um dia para o outro.
8. A solução teve o tampão trocado por solução salina, HEPES a
20 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, 4°C com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.
9. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y) foram calculadas a partir das massas inseridas.
- 25 Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote T-TH2C/A/WY070209

O conjugado lote TTH2C/A/WY070209 foi analisado por perfis de eluição por HPSEC (monitorados a 280 nm). A mudança do sinal de proteína de 17,5 a 14 minutos foi observada com a conjugação, e pouca proteína livre não-conjugada restava após conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo meningocócico A, C, W135 ou Y em cada fração do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos.

cos para cada polissacarídeo (Figura 15).

Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote T-TH2C/A/WY070209

O conjugado foi usado para imunizar um grupo de 15 camundongos com mistura de polissacarídeo nativo (5 camundongos) como controle a 0,1 µg de cada PS/dose para Mn A, W135 e Y e 0,2 µg/dose para Mn C nos dias 0, 7 e 14. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) uma semana após a 3ª injeção determinados por ELISA são Mn A, 1 (1, 1; 1 intervalo de confiança SD); Mn C, 34 (10, 109); Mn W135, 1 (1, 1); e Mn Y, 28 (5, 166) para o grupo de controle, e Mn A, 10.303 (5.480, 19.371); Mn C, 12.815 (7.350, 22.343); Mn W135, 3.111 (1.490, 6.494); e Mn Y, 9.457 (4.280, 20.894) para o conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS (Tabela 13a). Os conjugados induziram 338-10.303 vezes mais anticorpo anti-PS de Mn específico em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo. As médias geométricas da titulação bactericida induzida uma semana após a 3ª injeção determinada por ensaio bactericida são Mn A, 260 (127, 533; 1 DP de intervalo de confiança), MnC, 92 (76, 111); Mn W135, 858 (587, 1.254); e Mn Y, 462 (53, 3.998) para o grupo de controle, e Mn A, 4.321 (2.192, 8.521), Mn C, 1.755 (931, 3.310); Mn W135, 20.030 (4.288, 93.566); e Mn Y, 7.728 (2.811, 21.244) para a batelada de conjugado (Tabela 13b). Os conjugados induziram 17-23 vezes mais titulação bactericida em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

Tabela 13a. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com 1 DP de intervalo de confiança de grupos de camundongos (5 camundongos para controle de mistura de PSs nativos e 15 camundongos para o experimento) uma semanas após a 3ª imunização com 0,1 µg/dose de cada PS de Mn A, W135 e Y e 0,2 µg/dose para Mn C no conjugado multivalente lote TTH2C/A/WY070209.

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote TTH2C/AWY070209	Aumento em vezes
A	1 (1, 1)	10.303 (5.480, 19.371)	10.303
C	34 (10, 109)	12.815 (7.350, 22.343)	377
W135	1 (1, 1)	3.111 (1.490, 6.494)	3.111
Y	28 (5, 166)	9.457 (4.280, 20.894)	338

a. Comparado com um soro de referência de cada PS com um nível de anti-corpo anti-PS de Mn presumido de 3.200 unidades/ml.

5 Tabela 13b. A média geométrica da titulação bactericida com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (5 camundongos para controle de mistura de PS nativo e 15 camundongos para o experimento) uma semana após a 3ª imunização com 0,1 µg/dose de cada PS de Mn A, W135 e Y e 0,2 µg/dose para Mn C no conjugado multivalente lote TTH2C/AWY070209

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote T-TH2C/AWY070209	Aumento em vezes
A	260 (127, 533)	4.321 (2.192, 8.521)	17
C	92 (76, 111)	1.755 (931, 33.10)	19
W135	858 (587, 1.254)	20.030 (4.288, 93.566)	23
Y	462 (53, 3.998)	7.728 (2.811, 21.244)	17

10 Método B – [Conjugado dos Grupos A, C, W135 – Meningocócicos multivalentes sintetizados combinados e polissacarídeos y-toxóide tetânico] lote TTHIAC/WY070210B(2:2)

Ativação de TT para conter grupos hidrazida

1. Toxóide tetânico (4,2 mg/ml) foi ativado com hidrazina a 0,42 M na presença de EDC a 30 mM, 0,1 M de MES, pH 5,5 a 20-24°C.
- 15 2. Após reação por 3 horas, o pH da mistura de reação foi elevado até 7,5-10 com NaOH a 1 N para interromper a reação.
3. A mistura de reação teve o tampão trocado com NaCl a 30 mM, Na₂CO₃ a 3 mM, pH em torno de 10,5 a 4°C com o uso de uma membrana de diálise de 12-14 KDa.

20 Ativação de mistura de PSs de Mn A e C para conter grupos cianato

Uma mistura de PSs de Mn A e C (1:1, P/P; 0,025 ml, 10 mg/ml)

foi ativada com 1,5 µl de CDAP (100 mg/ml em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24°C na presença de 1 µl de trietilamina a 0,2 M.

Conjugação de mistura de PSs ativados de Mn A e C ao TT ativado

1. O polissacarídeo ativado foi misturado com 200 µl de 2x PBS
5 gelado, pH 7,4, seguido por adição de 0,5 mg de TTH gelado.

2. Incubada a mistura de reação a 4°C com agitação suave de um dia para o outro.

Ativação de mistura de PSs de Mn W135 e Y para conter grupos cianato

Uma mistura de PSs de Mn W135 e Y (1:1, P/P; 0,025 ml, 10
10 mg/ml) foi ativada com 1,5 µl de CDAP (100 mg/ml em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24°C na presença de 1 µl de trietilamina a 0,2 M.

Conjugação de mistura de PSs ativados de Mn W135 e Y ao TT ativado na mistura de reação de TTH + Mn A e C ativado

1. A mistura ativada de Mn W135 e Y foi misturada com a mistu-
15 ra de reação de TTH + Mn A e C ativado no gelo.

2. Incubada a mistura de reação a 4°C com agitação suave por 3 dias inteiros (a incubação prolongada é para assegurar a conjugação completa, bem como a decomposição dos grupos cianato residuais não reagidos que sobrem).

20 3. A solução teve o tampão trocado a 4°C com solução salina, HEPES a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, com o uso de uma membrana com valor de corte do peso molecular de 12-14 KDa.

4. O volume do conjugado dialisado foi determinado, e as concentrações da proteína (TT) e de cada polissacarídeo (Mn A, C, W135 e Y)
25 foram calculadas a partir das massas inseridas.

Caracterização do conjugado multivalente combinado sintetizado lote TTHI-AC/WY070210B(2:2)

O conjugado lote TTHIAC/WY070210B(2:2) foi analisado por perfis de eluição por HPSEC (monitorados a 280 nm). A mudança do sinal
30 de proteína de 17,5 a 14 minutos foi observada com a conjugação, e pouca proteína livre não-conjugada restava após conjugação. O polissacarídeo conjugado de cada sorogrupo meningocócico A, C, W135 ou Y em cada fra-

ção do perfil de HPLC foi detectado por ELISA com respectivos anticorpos específicos para cada polissacarídeo.

Imunogenicidade do conjugado multivalente combinado sintetizado lote T-THIAC/WY070210B(2:2)

- 5 O conjugado foi usado para imunizar um grupo de 5 camundongos com polissacarídeo nativo como controle a 0,1 µg de cada polissacarídeo/dose nos dias 0, 7 e 14. As médias geométricas dos níveis induzidos de anticorpos (unidades/ml) uma semana após a 3ª injeção determinadas por ELISA são: Mn A, 1 (1, 1; 1 intervalo de confiança SD); MnC, 34 (10, 109);
- 10 Mn W135, 1 (1, 1); e Mn Y, 28 (5, 166) para o controle, e Mn A, 5.873 (3.966, 8.699); Mn C, 3.465 (2.109, 5.695); Mn W135, 3.798 (2.090, 6.900); e Mn Y, 22.423 (11.933, 42.133) para o grupo de conjugado, presumindo-se 3.200 unidades/ml para o soro de referência de cada PS (Tabela 14a). Os conjugados induziram 102-5.873 vezes mais anticorpo anti-PS de Mn específico
- 15 em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo. As médias geométricas da titulação bactericida induzida uma semana após a 3ª injeção determinadas por ensaio bactericida são: Mn A, 260 (127, 533; 1 intervalo de confiança SD), MnC, 92 (76, 111); Mn W135, 858 (587, 1.254); e Mn Y, 462 (53, 3.998) para o grupo de controle, e Mn A, 4.127 (2.196,
- 20 7.756), Mn C, 1.331 (588, 3.010); Mn W135, 38.508 (17.971, 82.515); e Mn Y, 11.506 (7.700, 17.194) para a batelada de conjugado (Tabela 14b). Os conjugados induziram 14-45 vezes mais titulação bactericida em camundongos, quando comparados com o controle de PS de Mn nativo.

- Tabela 14a. A média geométrica dos níveis^a de anticorpos anti-PS de Mn com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (5 camundongos para controle de mistura de PSs nativos e 5 camundongos para o experimento) uma semana após a 3ª imunização com 0,1 µg/dose de cada um dos PSs de Mn no conjugado multivalente lote TTHIAC/WY070210B(2:2).
- 25

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	Lote TTHI-AC/WY070210B(2:2)	Aumento em vezes
A	1 (1, 1)	5.873 (3.966, 8.699)	5873
C	34 (10, 109)	3.465 (2.109, 5.695)	102
W135	1 (1, 1)	3.798 (2.090, 6.900)	3798
Y	28 (5, 166)	22.423 (11.933, 42.133)	801

a. Comparado com um soro de referência de cada PS com um nível de anti-corpo anti-PS de Mn presumido de 3.200 unidades/ml.

5 Tabela 14b. A média geométrica da titulação bactericida com 1 intervalo de confiança SD de grupos de camundongos (5 camundongos por grupo) uma semana após a 3ª imunização com 0,1 µg/dose de cada um dos PSs de Mn no conjugado multivalente lote TTHIAC/WY070210B(2:2).

Polissacarídeo	Mistura de PS nativo	LotTTHIAC/WY070210B(2:2)	Aumento em vezes
A	260 (127, 533)	4.127 (2.196, 7.756)	16
C	92 (76, 111)	1.331 (588, 3.010)	14
W135	858 (587, 1.254)	38.508 (17.971, 82.515)	45
Y	462 (53, 3.998)	11.506 (7.700, 17.194)	25

10 Em função das muitas modalidades possíveis às quais os princípios da invenção descrita podem ser aplicados, deve-se reconhecer que as modalidades ilustradas são apenas exemplos preferidos da invenção e não devem ser consideradas como limitantes do escopo da invenção. Em vez disso, o escopo da invenção é definido pelas reivindicações seguintes. Portanto, reivindicamos como incluído em nossa invenção tudo que estiver dentro do escopo e do espírito das reivindicações.

15 LISTAGEM DE REFERÊNCIAS

1. Avery O.T., Goebel W.F. "Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrates. II. Immunological specificity of synthetic sugar-proteins". *J. Exp. Med.* 1929; 50: 533-550.

2. Schneerson R., Barrera O., Sutton A., Robbins J.B. "Prepara-

tion, characterization, and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide protein conjugates". *J. Exp. Med.* 1980; 152: 361-376.

3. Anderson P. "Antibody responses to Haemophilus influenzae type b and diphtheria toxin induced by conjugation of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM₁₉₇". *Infect. Immun.* 1983, 39: 233-238.

4. Marburg S., Jorn D. Tolman R.L., *et al.* "Bimolecular chemistry of macromolecules: synthesis of bacterial polysaccharide conjugates with Neisseria meningitidis membrane protein". *J. Amer. Chem. Soc.* 1986; 108: 5.282-5.287.

5. Kniskern P.J., Marburg S. "Conjugation: design, chemistry, and analysis". Em: Ellis R.W., Granoff D.M., editores. "Development and clinical uses of Haemophilus b conjugate vaccines". Nova York: Marcel Dekker, 1994: 37-69.

6. Chu C., Schneerson R., Robbins J.B., Rastogi S.C. "Further studies on the immunogenicity of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal type 6B polysaccharide-protein conjugates". *Infect. Immun.* 1983; 40: 245-256.

7. Schneerson R., Robbins J.B., Parke J.C., Bell C., Schlesselman J.J., Sutton A., Wang Z., Schiffman G., Karpas, A. Shiloach J. "Quantitative analysis of serum antibodies elicited in adults by Haemophilus influenzae type b and pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates". *Infect. Immun.* 1986, 52: 519-528.

8. Anderson P.W., Pichichero M.E., Stein E.C., Porcelli S., Betts R.F., Connuck D.M., Korones D., Insel R.A., Zahradnik J.M., Eby R. "Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal group, and hapten loading on the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of Haemophilus influenzae type b capsular antigen unterminally coupled to the diphtheria protein CRM₁₉₇". *J. Immunol.* 1989; 142: 2.464-8.

9. Jennings H.J., Lugowski C. "Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates". *J. Immunol.* 1981; 127: 1.011-8.

10. Beuvery E.C., Roy R., Kanhai V. *et al.* "Characteristics of two types of meningococcal group C polysaccharide conjugates using tetanus toxoid as protein carrier protein". *Dev. Biol. Stand.* 1986; 65: 197-204.
- 5 11. Beuvery E.C., Rossum F.V., Nagel J. "Comparison of the induction of immunoglobulin M and G antibodies in mice with purified pneumococcal type 3 and meningococcal group C polysaccharides and their protein conjugates". *Infect. Immun.* 1982; 37: 15-22.
- 10 12. Beuvery E.C., Delft R.V., Miedema F. *et al.* "Immunological evaluation of meningococcal group C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate in mice". *Infect. Immun.* 1983; 41: 609-17.
13. Costantino P., Viti S., Podda A. *et al.* "Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C". *Vaccine* 1992; 10: 691-8.
- 15 14. Richmond P., Borrow R., Miller E. *et al.* "Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory". *J. Infect. Dis.* 1999; 179: 1569-72.
- 20 15. Richmond P., Borrow R., Findlow J. *et al.* "Evaluation of de-O-acetylated meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy: Reactogenicity, immunogenicity, immunologic priming, and bactericidal activity against O-acetylated and de-O-acetylated serogroup C strains". *Infect. Immun.* 2001; 69: 2378-82.
- 25 16. Beuvery E.C., Miedema F., Delft R.V. *et al.* "Preparation and Immunochemical characterization of meningococcal group C polysaccharide-tetanus toxoid conjugates as a new generation of vaccines". *Infect. Immun.* 1983; 40: 39-45.
17. Beuvery E.C., Miedema F., Delft R.V. *et al.* "Vaccine potential of meningococcal group C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate". *J. Infect.* 1983; 6: 247-55.
- 30 18. Guo Z., Jennings H. "Protein-polysaccharide conjugation. In: Pollard AJ, Maiden MC (eds) *Methods in Molecular Medicine*, vol 66: *Meningococcal Vaccines: methods and Protocols*", Humana Press, Totowa, NJ, 2001, pg 49-54.

19. Inman J.K., Dintzis H.M. "The derivatization of cross-linked polyacrylamide beads. Controlled introduction of functional groups for the preparation of special-purpose, biochemical adsorbents". *Biochemistry* 1969; 8: 4.074-4.082.
- 5 20. Shafer D.E., Toll B., Schuman R.F., Nelson B.L., Mond J.J., Lees A. "Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides". *Vaccine* 2000; 18(13): 1.273-1.281.
- 10 21. King T.P., Zhao S.W., Lam T. "Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage". *Biochemistry* 1986; 25: 5.774-5.779.
22. Patente U.S. 5.651.971.
- 15 23. Patente U.S. 5.965.714.
24. Patente WO 02058737.
25. Patente WO 03007985.
26. Catálogo Pierce 2003-2004, página 306.
- 20 27. Monsigny M., Petit C. e Roche A.C. "Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod". *Anal. Biochem.* 1988; 175: 525-530.
28. Patente WO 00004922.
29. Kohn J. e Wilchek M. "The use of cyanogens bromide and other cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins". *Applied Biochem. Biotechnol.* 1984; 9: 285-305.
- 25 30. Carey R.B., Eisenstein T.K., Shockman G.D., Greber T.F. e Swenson R.M. "Soluble group- and type-specific antigens from type III group B *Streptococcus*". *Infection and Immunity* 1980; 28: 195-203.
31. Lee C.H. e Frasch C.E. "Quantification of bacterial polysaccharides by the purpald assay: Measurement of periodate-generated formaldehyde from glycol in the repeating unit". *Anal. Biochem.* 2001; 296: 73-82.
- 30 32. Keleti G. e Lederer W.H. "Handbook of micromethods for the

biological sciences. 61. Hexoses (Anthrone)". Página 73. Van Nostrand Reinhold Co., Nova York, 1974.

33. Keleti G. e Lederer W.H. "Handbook of micromethods for the biological sciences. 70. Phosphorus (Total)". Página 84. Van Nostrand Reinhold Co., Nova York, 1974.

34. Vidal J. "Trinitrophenyl-protein conjugates are more complex than it is currently thought". *J. Immunol. Methods* 1986; 86: 155-156.

35. Catálogo Pierce 2003-2004, páginas 241 e 305.

36. Patente WO 2005/014037 A2.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um conjugado imunogênico multivalente complexo, caracterizado pelo fato de que compreende:

- reagir diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos selecionados do grupo que consiste em no grupo meningocócico A, grupo meningocócico C, grupo meningocócico W135 e grupo meningocócico Y com um agente oxidante, resultando em uma mistura de diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos ativados por aldeído;
- reagir uma ou mais proteínas toxóides tetânicas com hidrazina, carboidrazida, cloreto de hidrazina, uma diidrazida ou uma mistura destas para produzir uma solução de uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida;
- contatar a mistura dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos ativados por aldeído com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida em um pH de 5 a 8, de tal forma que os diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por aldeído distintos simultaneamente reajam com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida, resultando em um conjugado multivalente complexo que inclui uma ou mais ligações duplas C=N formadas entre cada polissacarídeo meningocócico imunogênico distinto anexado e a proteína toxóide de tétano; e
- reduzir as ligações duplas C=N do conjugado multivalente complexo em ligações C-N, resultando em um produto conjugado imunogênico multivalente complexo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida são solúveis em pH neutro.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a reação simultânea dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por aldeído

do distintos com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida resulta em uma composição que inclui a mistura dos

diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos ativados por aldeído e uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o contato da mistura dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos ativados por aldeído com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida e a redução das ligações duplas C=N compreende o fornecimento, na presença de boroidreto de sódio, de uma composição formada pela mistura dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos ativados por aldeído e uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida.

5. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que uma ou mais proteínas toxóides tetânicas são reagidas com hidrazina, carboidrazida, cloreto de hidrazina, uma diidrazida ou uma mistura das mesmas, na presença de: (i) uma carbodiimida e (ii) um ou mais aminoácidos, um ou mais peptídeos, ou uma mistura de um ou mais aminoácidos e um ou mais peptídeos.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o aminoácido é selecionado de um ou mais de lisina, arginina, histidina, glicina, serina, treonina, ácido glutâmico ou cisteína.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma ou mais proteínas toxóides tetânicas são reagidas com hidrazina, carboidrazida, succinil diidrazida, diidrazida de ácido adípico ou uma mistura das mesmas, na presença de um cloridrato de carbodiimida em um pH de 6 a 7 para obter uma solução de proteína toxóide de tétano ativada por hidrazida, e que ainda compreende a troca de tampão da solução de proteína toxóide de tétano ativada por hidrazida até um pH de 10,0 a 11,0.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma ou mais proteínas toxóides tetânicas são reagidas com hidrazina, carboidrazida, succinil diidrazida, diidrazida de ácido adípico ou uma mistura das mesmas, na presença de um cloridrato de carbodiimida em um pH de 5,5 a 6,5 para obter uma solução de proteína toxóide de tétano ativada por hidrazida, e que ainda compreende a troca de tampão da solução

de proteína toxóide de tétano ativada por hidrazida até um pH de 10,0 a 11,0.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que 2 a 28 polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por aldeído distintos são reagidos simultaneamente com uma ou mais
5 proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por aldeído distintos são reagidos com uma única proteína toxóide de tétano ativada por hidrazida.

10 11. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a carbodiimida é cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida.

12. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a carbodiimida é cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil
15 carbodiimida.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma mistura de polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos é reagida com o agente oxidante.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
20 fato de que cada polissacarídeo meningocócico imunogênico distinto é inicialmente reagido com um agente oxidante, e a seguir os polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por aldeído distintos resultantes individuais são misturados em conjunto para formar a mistura de polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por aldeído distintos.

25 15. Método para a produção de um conjugado imunogênico multivalente complexo, caracterizado pelo fato de que compreende:

- reagir diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos selecionados do grupo que consiste no grupo meningocócico A, grupo meningocócico C, grupo meningocócico W135 e grupo meningocócico
30 Y com um agente de cianilação, resultando em uma mistura de diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos;
- reagir de uma ou mais proteínas com hidrazina, carboidrazida,

dicloreto de hidrazina, uma diidrazida, ou uma mistura das mesmas, para produzir uma solução de uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida; e

- contatar a mistura dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida em um pH de 6 a 8, de tal forma que os diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos simultaneamente reajam com uma ou mais proteínas ativadas por hidrazida, resultando em um conjugado imunogênico multivalente complexo que inclui uma ou mais ligações C-N formada entre cada polissacarídeo meningocócicos imunogênico distinto anexado e a proteína toxóide de tétano.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o agente de cianilação é selecionado de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamonipiridínio, brometo de cianogênio ou tetrafluoroborato de N-ciano-N,N,N-trietilamônio.

17. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a reação simultânea dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida resulta em uma composição que inclui a mistura dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos e uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida.

18. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o contato da mistura dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida compreende a preparação de uma composição de reação que inclui a mistura dos diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida.

19. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que ainda compreende a reação de um segundo grupo de segundos

polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos selecionado de pelo menos um grupo meningocócico W135 ou grupo meningocócico Y com um agente de cianilação, resultando em uma segunda mistura de diversos segundos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos; e

- o contato da segunda mistura de diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por cianato distintos com o conjugado imunogênico multivalente complexo, em que o conjugado imunogênico multivalente complexo compreende um primeiro polissacarídeo meningocócico imunogênico distinto selecionado de pelo menos um grupo meningocócico A ou meningocócico C para formar uma ou mais ligações C-N entre cada segundo polissacarídeo meningocócicos imunogênico ativado por cianato distinto e a proteína toxóide de tétano, em que a reatividade dos segundos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos com o agente de cianilação é maior do que a reatividade dos primeiros polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos com o agente de cianilação.

20. Método para a produção de um conjugado imunogênico multivalente complexo, caracterizado pelo fato de que compreende:

- reagir uma proteína com 1-amino-2,3-propanodiol (ADPO) na presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida em um pH de 5,5 a 7, resultando em uma solução de uma proteína toxóide de tétano modificada por ADPO;

- reagir a proteína toxóide de tétano modificada por ADPO com um agente oxidante, resultando em uma solução de uma proteína toxóide de tétano ativada por aldeído;

- contactar uma mistura de diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por hidrazida distintos selecionados do grupo que consiste no grupo meningocócico A, grupo meningocócico C, grupo meningocócico W135 e grupo meningocócico Y com a proteína toxóide de tétano ativada por aldeído em um pH de 5 a 8, de tal forma que os diversos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por hidrazida

distintos simultaneamente reajam com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por aldeído resultando em um conjugado multivalente complexo que inclui uma ou mais ligações duplas C=N formadas entre cada polissacarídeo meningocócicos imunogênico distinto anexado e a proteína toxóide de tétano; e

- a redução das ligações duplas C=N do conjugado multivalente complexo em ligações C-N, resultando em um produto conjugado imunogênico multivalente complexo.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a proteína toxóide de tétano é reagida com ADPO em um pH de 5,5 a 6,5.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a proteína toxóide de tétano é reagida com ADPO em um pH de 6 a 7.

23. Método para a preparação de uma proteína ativada por hidrazida, caracterizado pelo fato de que compreende:

- reagir uma proteína toxóide de tétano com hidrazina, carboidrazida, cloreto de hidrazina, uma diidrazida, ou uma mistura destas, na presença de: (i) uma carbodiimida e (ii) um ou mais aminoácido, um ou mais peptídeos, ou uma mistura de um ou mais aminoácidos e um ou mais peptídeos.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a carbodiimida é cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida.

25. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o aminoácido é selecionado de um ou mais de lisina, arginina, histidina, glicina, serina, treonina, ácido glutâmico e cisteína.

26. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida é solúvel em pH neutro.

27. Método para a produção de um conjugado imunogênico multivalente complexo, caracterizado pelo fato de que compreende:

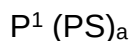
(a) contatar um ou mais primeiros polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por aldeído distinto selecionados do pelo menos um do grupo meningocócico A ou meningocócico C com uma ou mais proteínas toxóides tetânicas ativadas por hidrazida, para formar um primeiro intermediário conjugado, de tal forma que se forme uma ou mais ligações duplas C=N entre o primeiro polissacarídeo meningocócicos imunogênico distinto e a proteína toxóide de tétano;

(b) contatar um ou mais segundos polissacarídeos meningocócicos imunogênicos ativados por aldeído distinto selecionado do pelo menos um grupo meningocócico W135 ou meningocócico Y com o primeiro intermediário conjugado, de tal forma que se forme uma ou mais ligações duplas C=N entre o segundo polissacarídeo meningocócicos imunogênico distinto e a proteína toxóide de tétano; e

(c) a redução das ligações duplas C=N em ligações C-N, resultando em um produto conjugado imunogênico multivalente complexo;

em que a reatividade do primeiro polissacarídeo meningocócicos imunogênico ativado por aldeído distinto com a proteína toxóide de tétano ativada por hidrazida é menor do que a reatividade do segundo polissacarídeo meningocócicos imunogênico ativado por aldeído distinto com a proteína toxóide de tétano ativada por hidrazida.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 15, 20 e 27, caracterizado pelo fato de que o conjugado imunogênico multivalente complexo compreende uma estrutura de:



em que P^1 é a proteína toxóide de tétano; a é dois ou mais; e PS são os polissacarídeos meningocócicos imunogênicos distintos que estão, cada um, covalentemente ligados a P^1 .

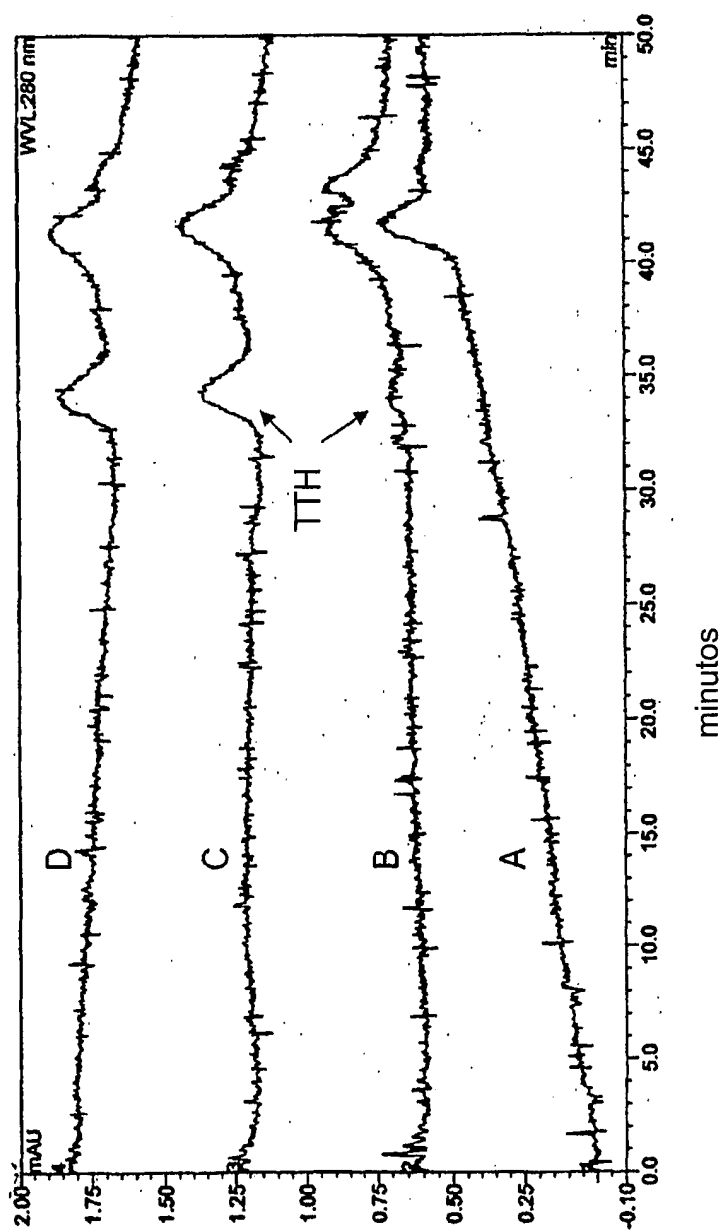


FIG. 1

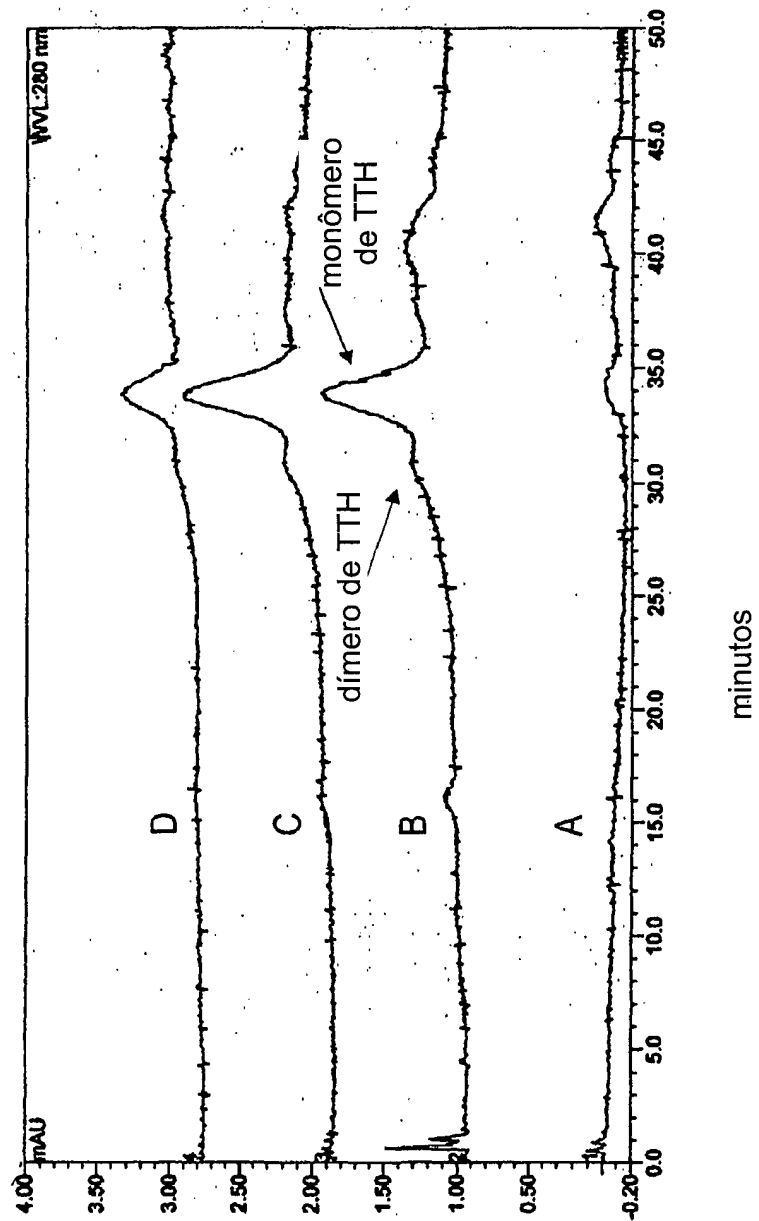


FIG. 2

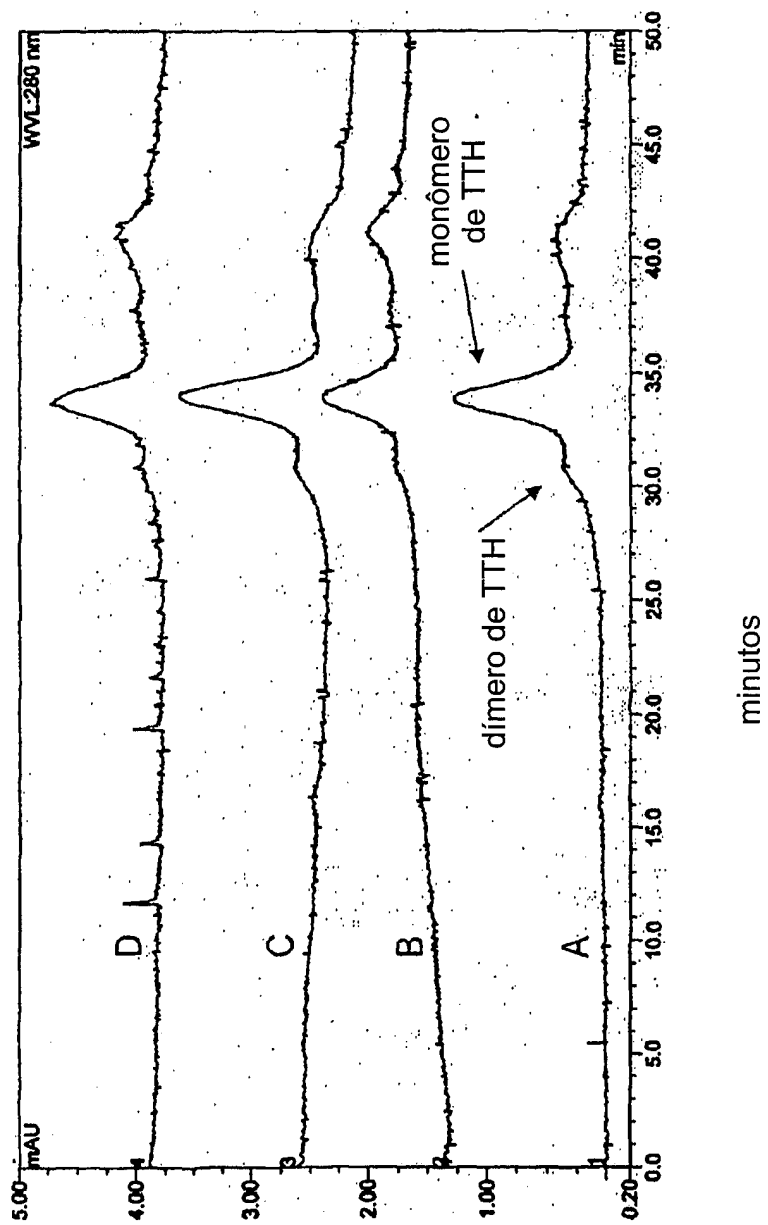


FIG. 3

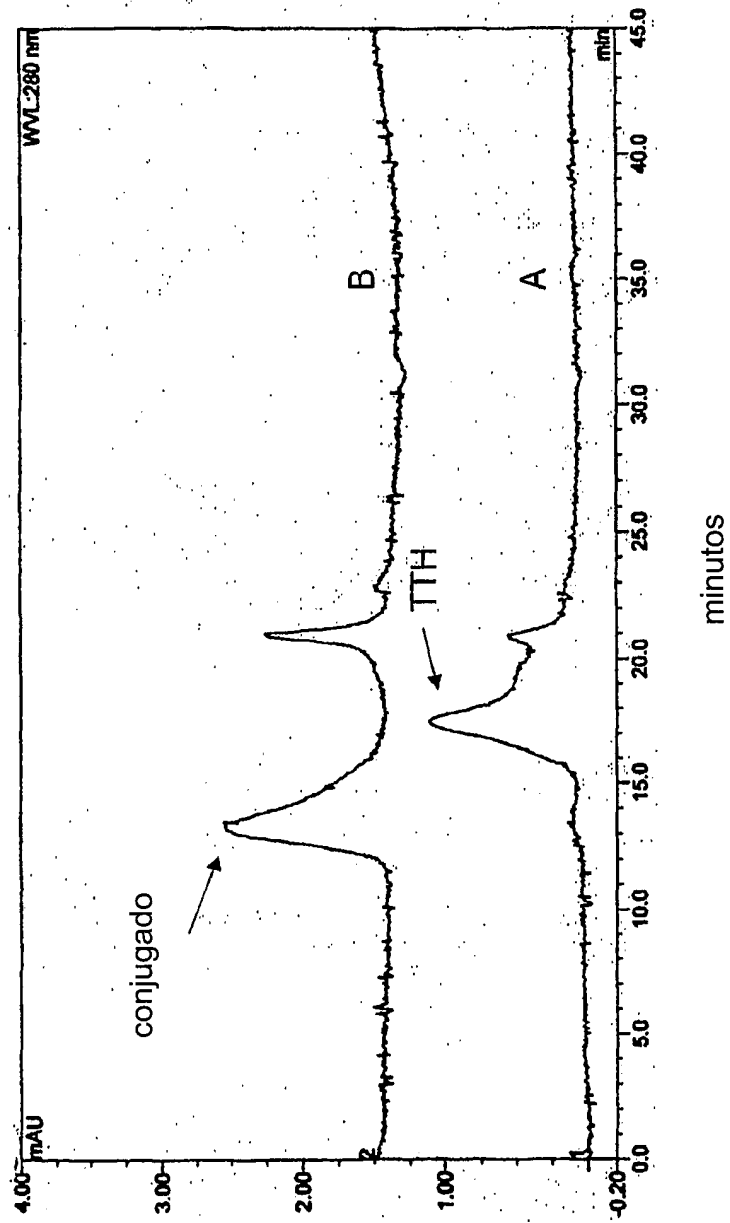


FIG. 4

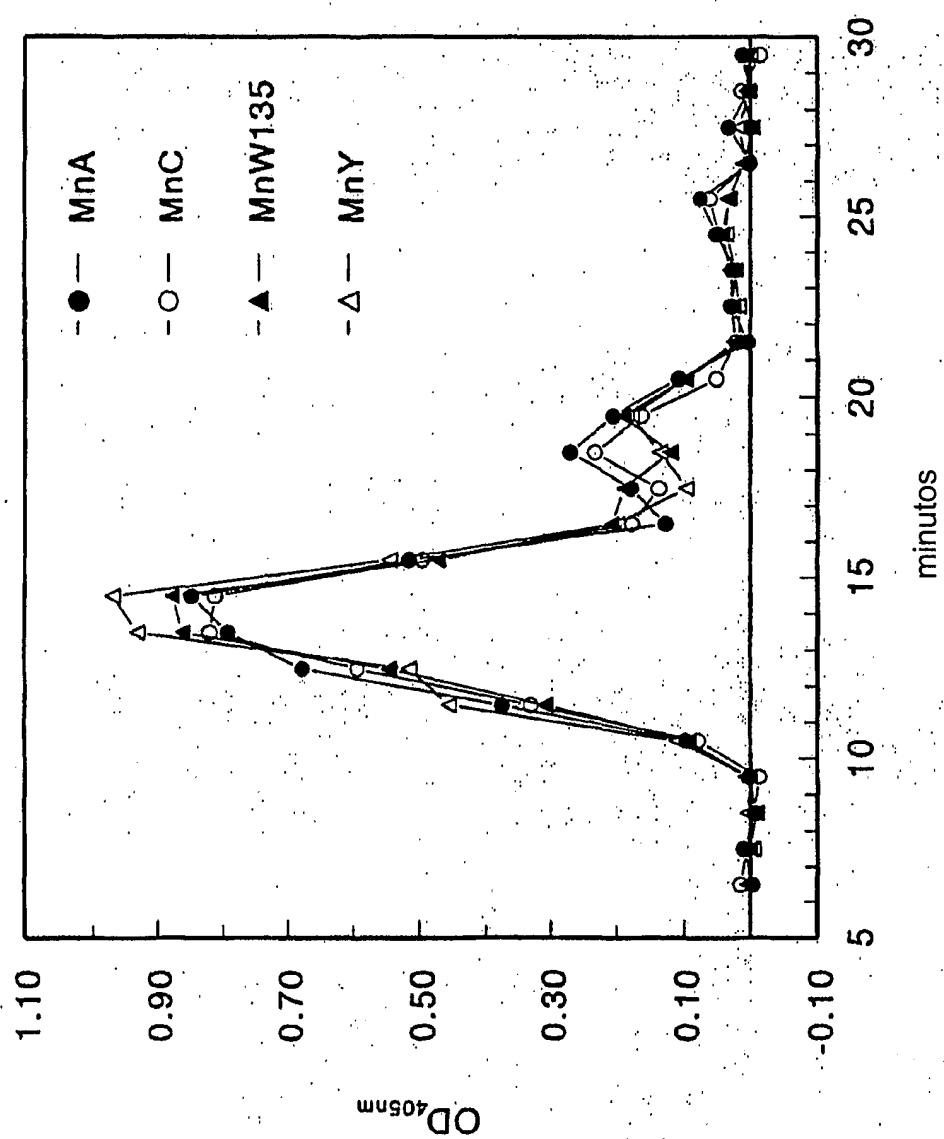


FIG. 5

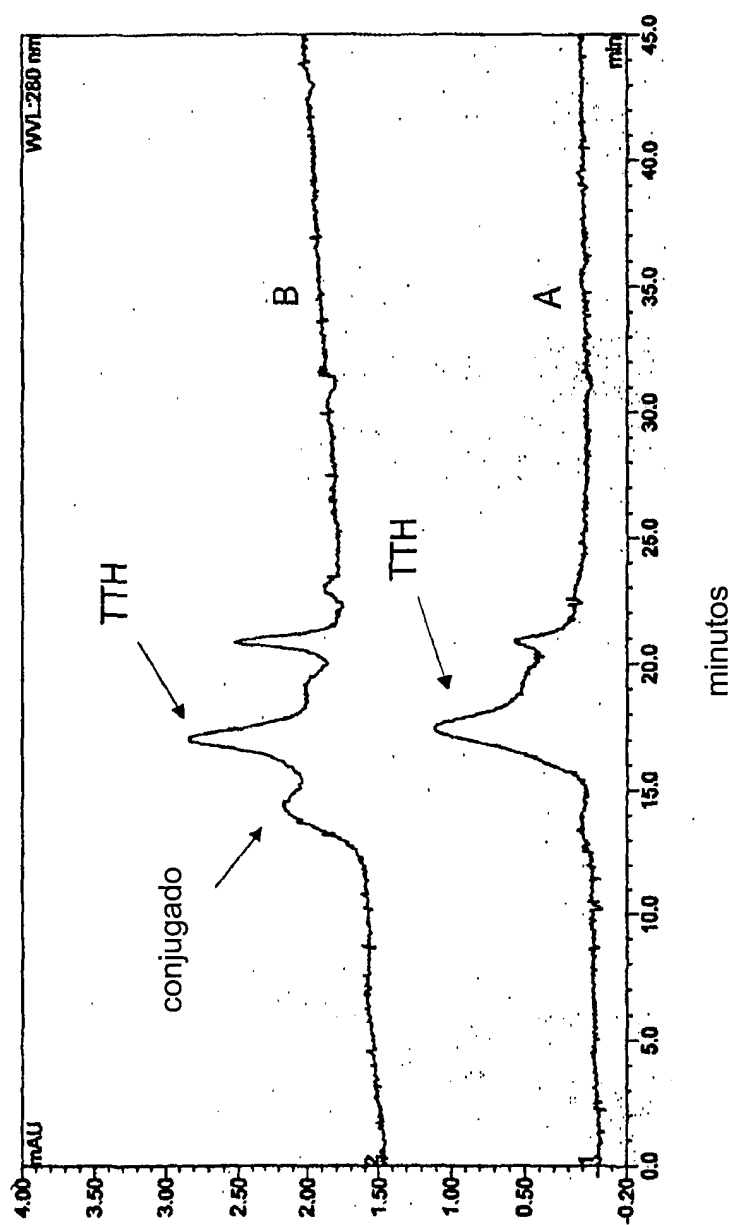


FIG. 6

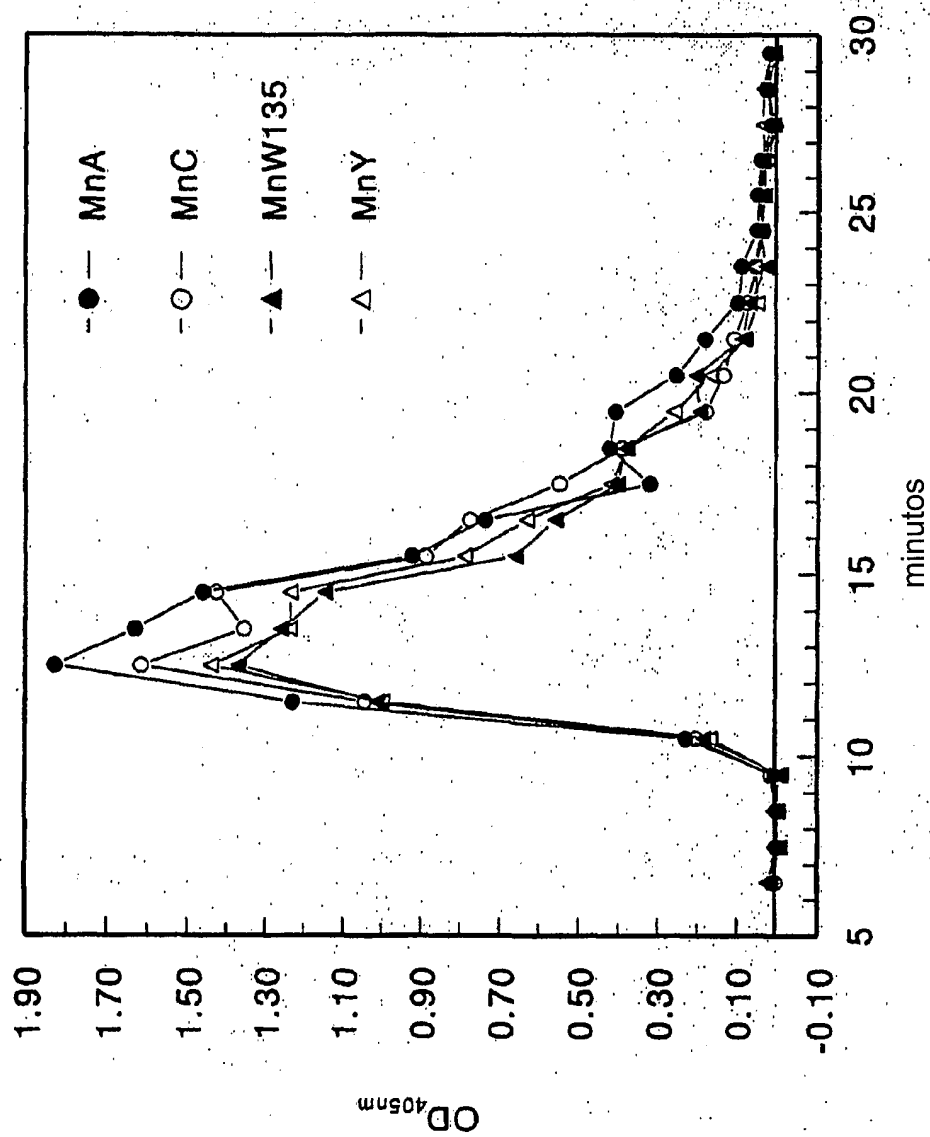


FIG. 7

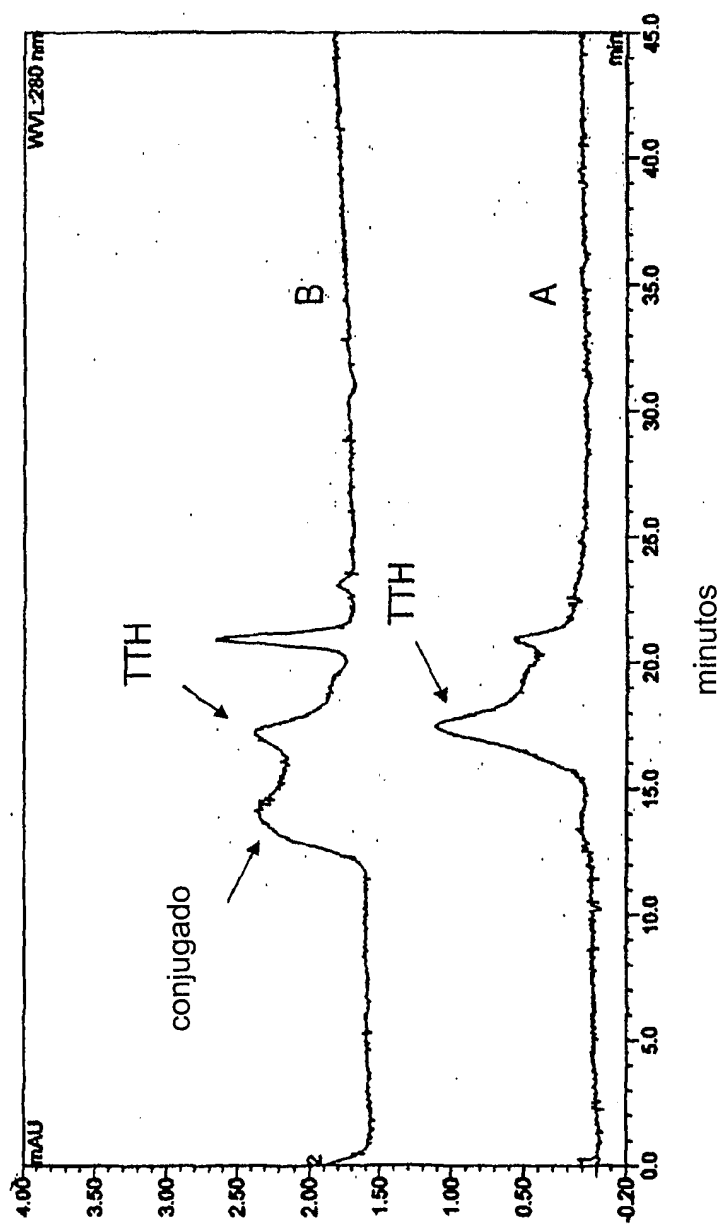


FIG. 8

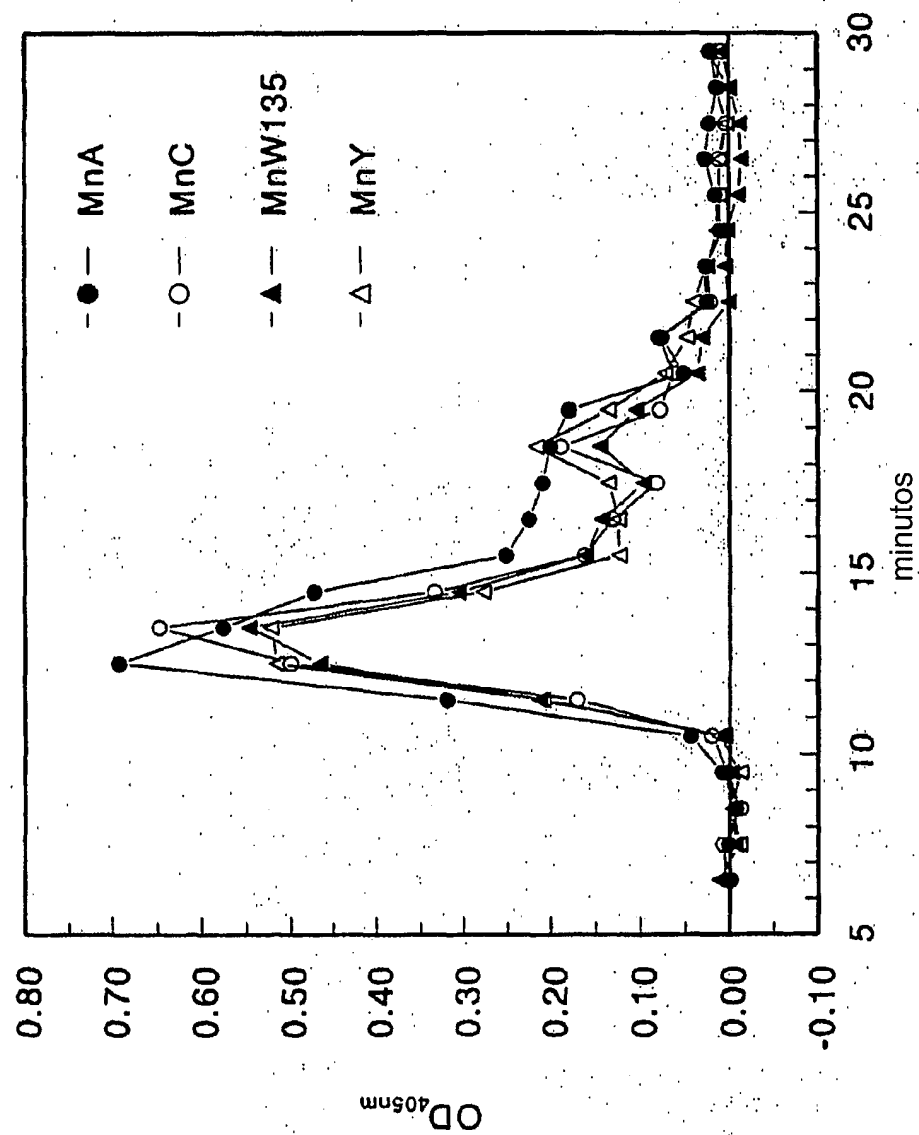


FIG. 9

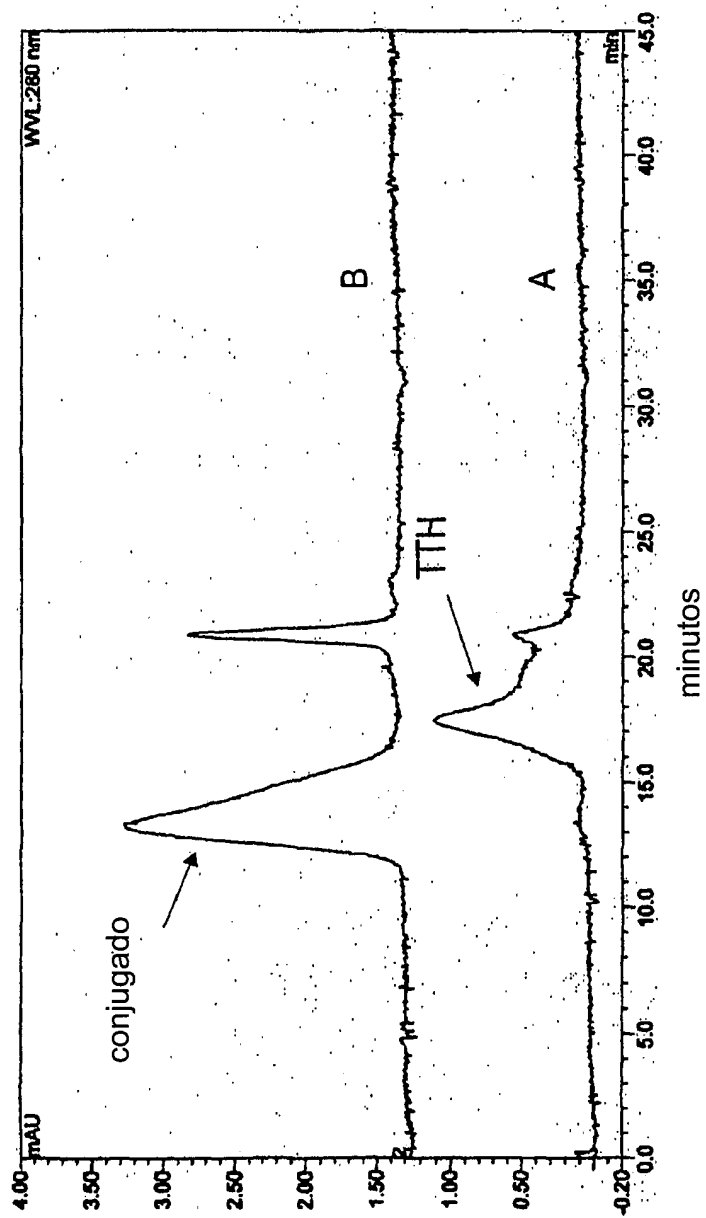


FIG. 10

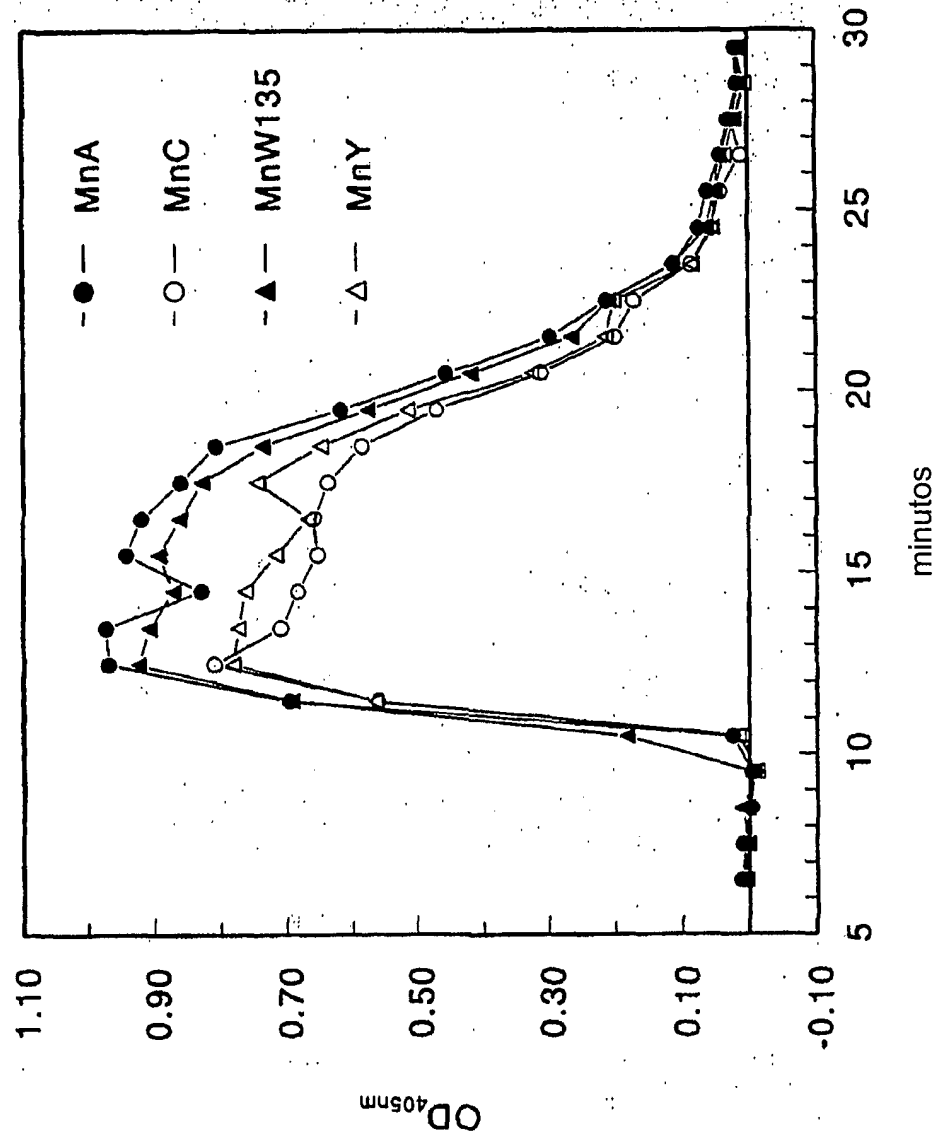


FIG. 11

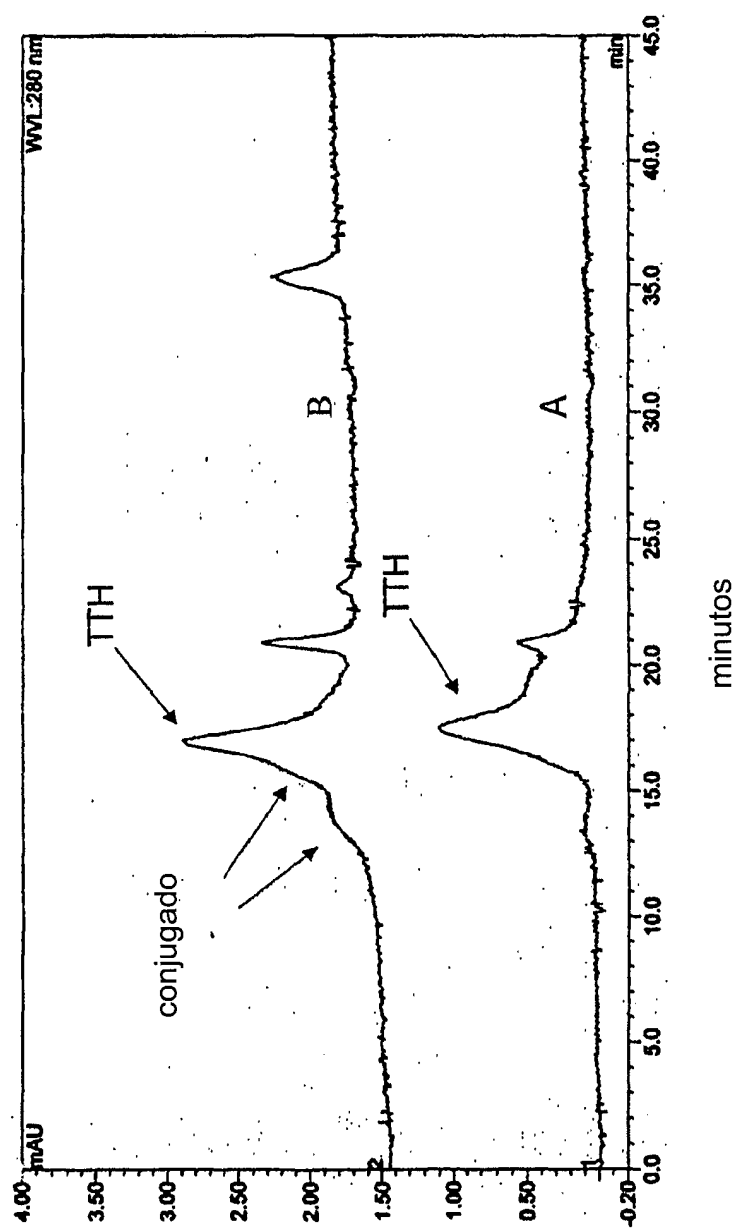


FIG. 12

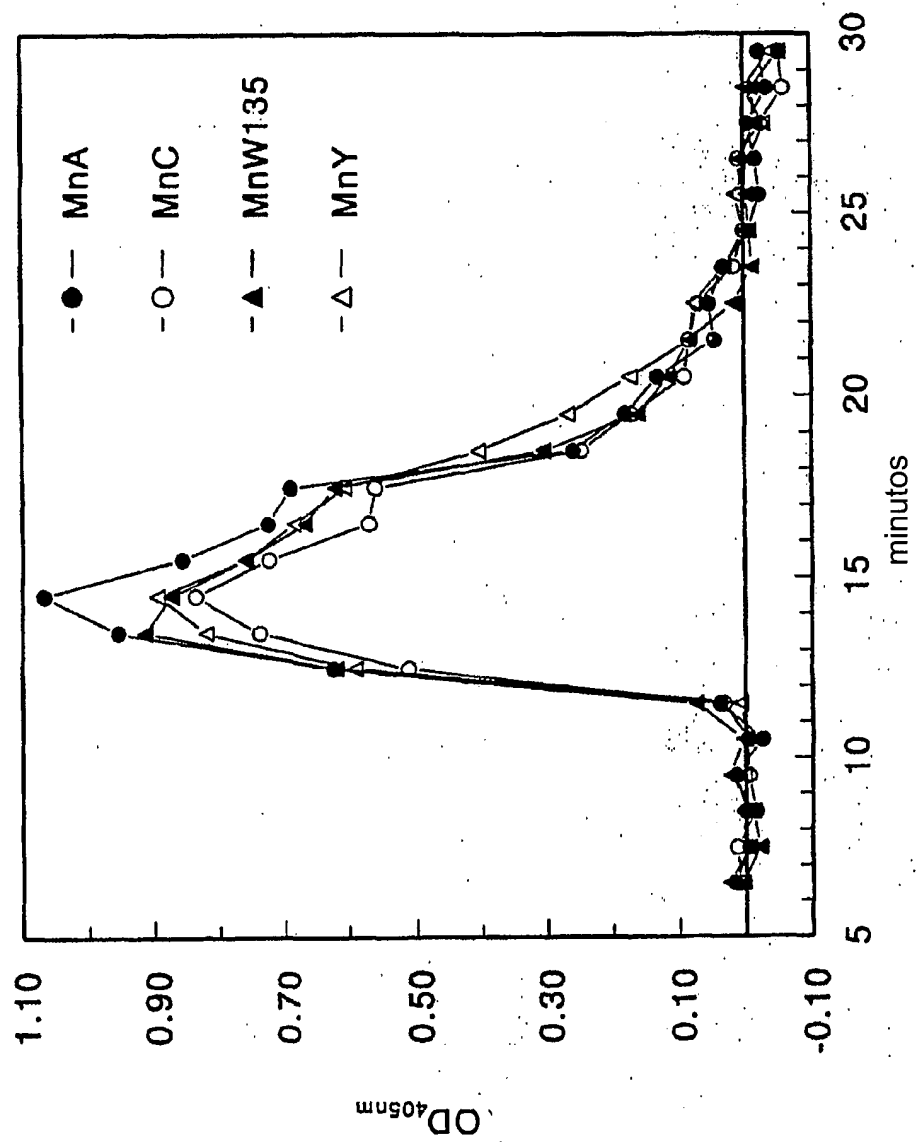


FIG. 13

Detecção por ELISA de PS componente conjugado –
z A, C, W135 e Y comparado com controle de PS nativo

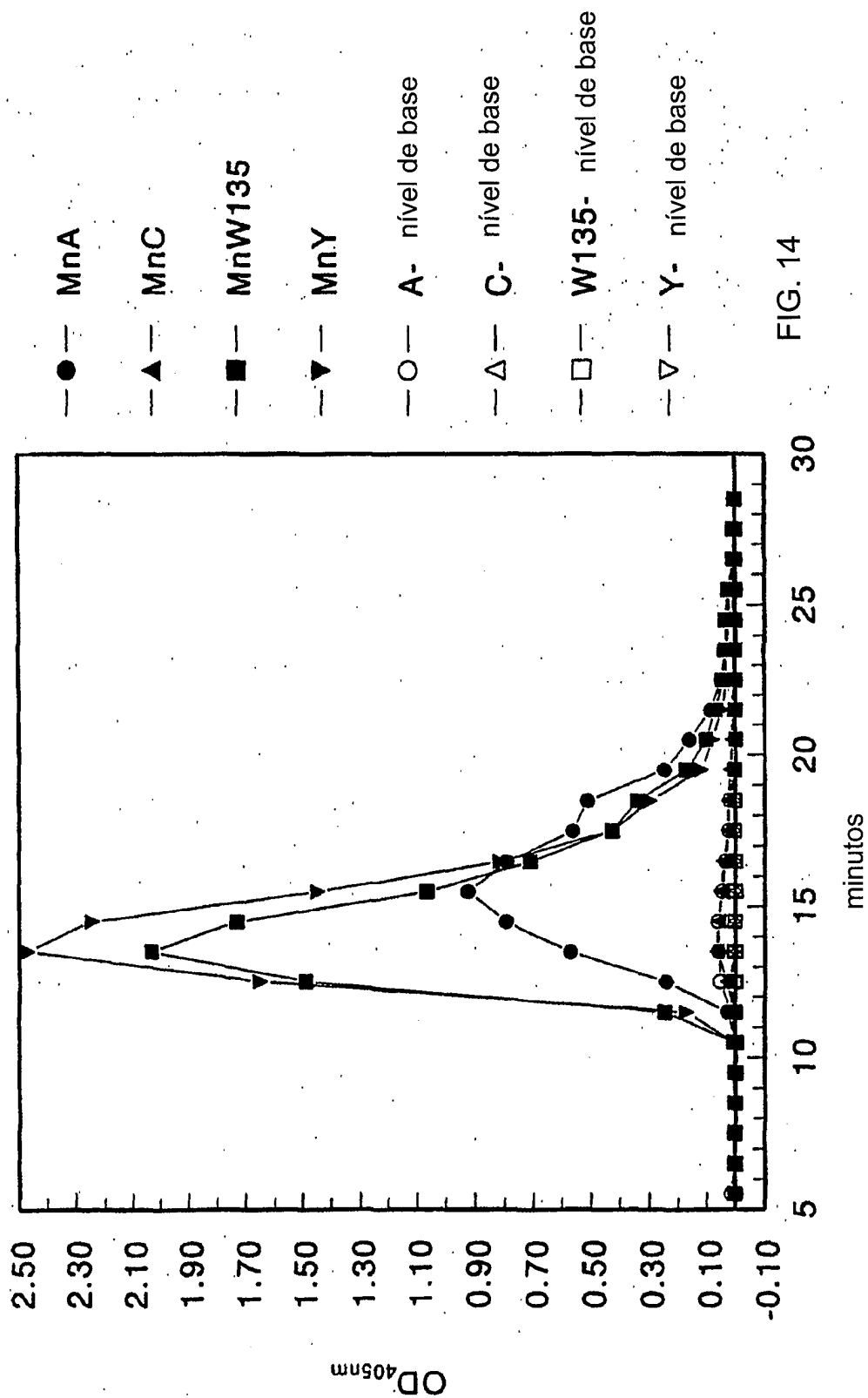


FIG. 14

Deteção por ELISA de PS componente conjugado –
A, C, W135 e Y comparado com controle de PS nativo

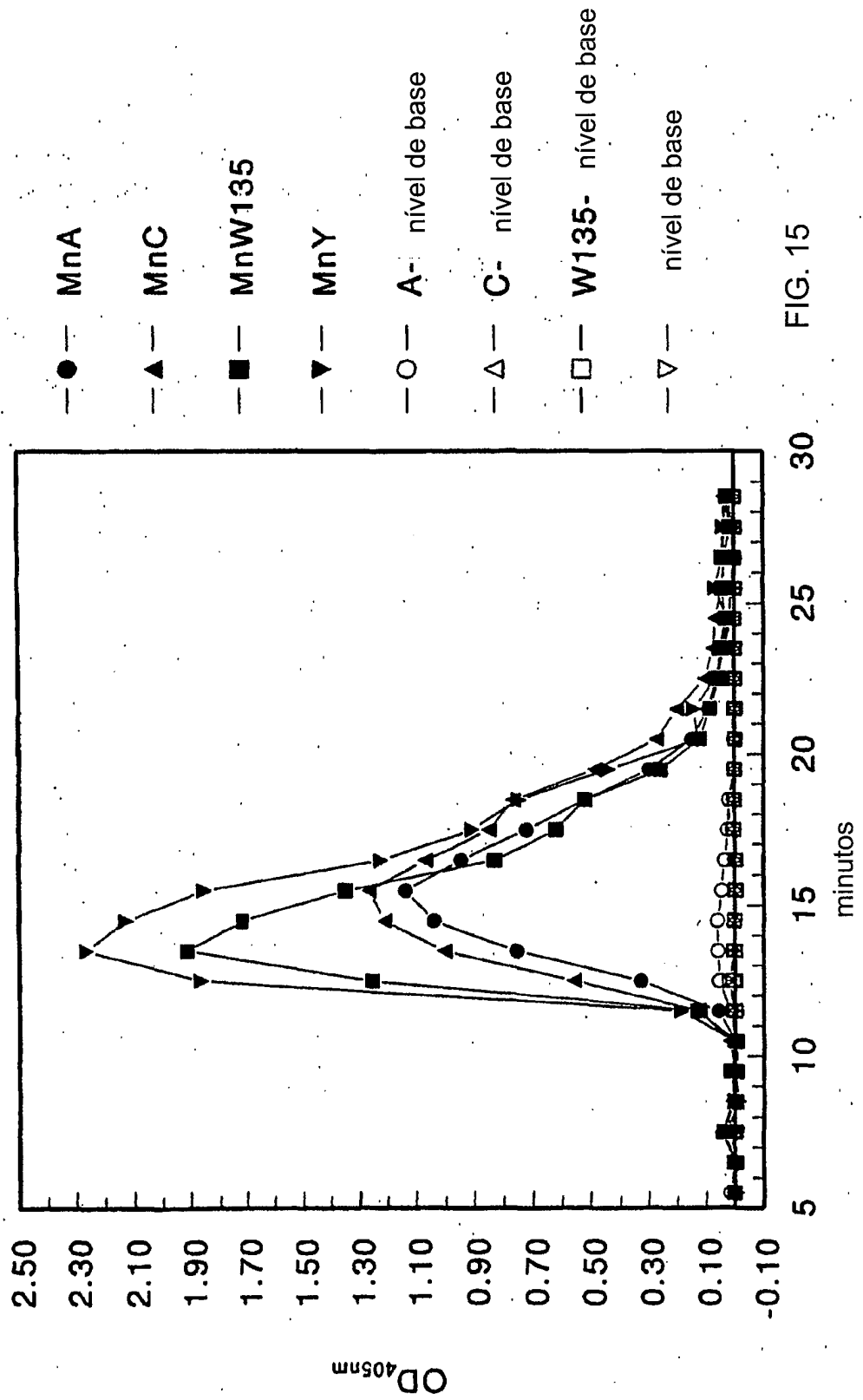


FIG. 15