



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

**(11) PI 0413309-9 B1**



**(22) Data do Depósito:** 06/08/2004

**(45) Data de Concessão:** 01/10/2019

---

**(54) Título:** MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VACINA CONJUGADA DE POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/02; A61K 39/385; A61K 39/39.

**(30) Prioridade Unionista:** 06/08/2003 US 60/493,389.

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

**(72) Inventor(es):** CHE-HUNG ROBERT LEE; CARL E. FRASCH.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2004025477 de 06/08/2004

**(87) Publicação PCT:** WO 2005/014037 de 17/02/2005

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 06/02/2006

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VACINA CONJUGADA DE POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA São providos métodos para a síntese e a fabricação de vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína de alto rendimento. Os métodos envolvem a reação de um grupo hidrazida sobre um reagente com um grupo éster aldeído ou cianato sobre o outro reagente. A reação procede rapidamente com uma alta eficiência de conjugação, tal que um processo simplificado de purificação pode ser empregado para separar o produto conjugado da não conjugada proteína e polissacarídeo e outros subprodutos de molécula pequena.

## “MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VACINA CONJUGADA DE POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA”

### Campo da Invenção

[001] Métodos para a síntese e a fabricação de vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína de alto rendimento são providos. Os métodos envolvem a reação de um grupo hidrazida sobre um reagente com um aldeído ou grupo éster cianato sobre o outro reagente. A reação procede rapidamente com alta eficiência de conjugação. Processos simplificados de purificação podem ser empregados para separar o produto da não conjugada proteína e polissacarídeo e outros subprodutos de molécula pequena.

### Fundamentos da Invenção

[002] Os polissacarídeos bacterianos (PSs) são antígenos T-independentes indutores da imunidade a curto prazo em crianças mais velhas e adultos, mas frequentemente não em bebês jovens. Os PSs são incapazes de se ligar às principais moléculas do complexo de histocompatibilidade, o que é requerido para a apresentação antígeno e estimulação de linfócitos T-auxiliares. Os PSs são capazes de estimular linfócitos B para a produção de anticorpo sem a ajuda dos linfócitos T-auxiliares. Como um resultado da estimulação T-independente, dos linfócitos B, existe uma ausência da indução de memória seguida de imunização por meio desses antígenos.

[003] Os antígenos polissacarídeos T-independentes podem ser convertidos a antígenos T-dependentes mediante ligação covalente dos polissacarídeos às moléculas de proteína. As células B que se ligam ao componente polissacarídeo da vacina conjugada podem ser ativadas por meio de células T-auxiliares específicas para peptídeos que são uma parte da proteína carreadora conjugada. A resposta T-auxiliar à proteína carreadora serve para aumentar a produção de anticorpo para o polissacarídeo. As vacinas PS-conjugado são híbridos de polissacarídeo-proteína

formados por meio da ligação covalente de uma proteína a um PS. A modificação química do PS antes da ligação é tipicamente requerida porque a maioria dos PSs bacterianos nativos não pode ser quimicamente ligada a uma proteína sem primeiramente experimentar alguma modificação química ("ativação").

[004]A ligação à proteína produz um número de epitopos de célula-T. Esses epitopos de célula-T interagem com as células CD4 T-auxiliares, facilitando grandemente uma resposta anticorpo ao polissacarídeo ligado. A resposta dependente de célula T-auxiliar a um conjugado resulta em ambos anticorpos IgG do soro e imunomemória, mesmo em crianças. Adicionalmente, a imunogenicidade do PS-conjugado, é menos dependente do tamanho do conjugado PS. Consequentemente, os conjugados preparados com um ou outro de PS ou oligossacarídeos podem ter imunogenicidade similares.

[005]Existem muitas reações de conjugação que têm sido empregadas para ligar de modo covalente polissacarídeo a proteínas. Três dos métodos mais comumente empregados incluem: 1) aminação redutora, onde o grupo aldeído ou cetona sobre um componente da reação reage com o grupo amino ou hidrazida sobre o outro componente, e a dupla ligação C=N formada é subsequentemente reduzida a ligação simples C-N por meio de um agente redutor; 2) conjugação por cianilação, onde o polissacarídeo é ativado ou por meio de brometo de cianogênios (CNBr) ou por meio de tetrafluorborato de 1-ciano-4-dimetilamonipiridínio (CDAP) para introduzir o grupo cianato ao grupo hidroxila, o qual forma uma ligação covalente ao grupo amino ou hidrazida sob adição do componente proteína; e 3) uma reação carbodiimida, onde a carbodiimida ativa o grupo carboxila sobre um componente da reação de conjugação, e o grupo carbonila ativado reage com o grupo amino ou hidrazida sobre o outro componente. Essas reações são também frequentemente empregadas para ativar os componentes do conjugado antes da reação de conjugação.

[006]Vacinas conjugadas *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) representam

as primeiras vacinas conjugadas de PS-proteína produzidas para uso clínico. Robins e seus colaboradores em 1980 utilizaram o processo biotecnológico de ligar quimicamente sacarídeos a carreadores proteína, um conceito desenvolvido 50 anos antes. Ver Avery e outros, J. Exp. Med. 1929; 50: 533-550; Schneerson e outros Exp. Med. 1929; 152: 361-376. Existem agora quatro diferentes vacinas conjugadas Hib licenciadas nos Estados Unidos, cada uma diferente, e cada uma possuindo suas próprias características físicas, químicas, e imunológicas, como sumariado na Tabela 1. Uma pesquisa detalhada da química de conjugação e do controle de qualidade utilizados nessas vacinas foi publicada. Ver Knistern e outros, "Conjugation: design, chemistry, and analysis" em Ellis e outros, Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines. New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69.

Tabela 1

| Vacina*                 | Tamanho do polissacarídeo | Proteína carreadora        | Separador (ligante)        |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| PRP-D (Connaught)       | Polissacarídeo            | Toxóide da difteria        | Separador 6-carbonos (ADH) |
| HbOC (Wyetg-Laderle)    | Oligossacarídeo           | Proteína da difteria (CRM) | Nenhuma (amida)            |
| PRP-OMPC (Merck)        | Polissacarídeo pequeno    | Proteína meningocócica     | Tioéter (bigenérico)       |
| PRP-T (Aventis Pasteur) | Polissacarídeo            | Toxóide do tétano          | Separador 6-carbonos (ADH) |

\* as quatro vacinas Hib conjugadas são descritas comumente na literatura com esses acrônimos e os fabricantes responsáveis estão em parêntesis.

[007]O primeiro conjugado Hib comercial, conjugado toxóide da difteria fosfato de poliribosilribitol (PRP-D), consiste em PS Hib parcialmente reduzido em tamanho ligado através de um separador de seis carbonos, diidrazida de ácido adípico

(ADH), ao toxóide da difteria utilizando o procedimento de Schneerson e outros, J. Exp. Med. 1980; 152: 361-376. O derivado ADH do toxóide da difteria foi obtido nesse método mediante a reação com ADH em presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC). A PS Hib foi então ativada mediante a criação de grupos cianato sobre os grupos hidroxila utilizando CNBr. A PS ativada foi conjugada ao ADH-toxóide (conjugação por cianilação), mas o processo criou uma ligação instável e o conjugado tinha problemas de solubilidade.

[008]A química de conjugação de Robbins foi posteriormente modificada tal que o separador ADH é acrescentado primeiramente ao polissacarídeo, o qual é em seguida conjugado à proteína purificada em presença de EDC (reação carbodiimida). Ver Chu e outros, Infect. Immun. 1983; 40: 245-256; Schneerson e outros, Infect. Immun. 1986, 52: 519-528. Essa modificação melhorou a eficiência da conjugação e a solubilidade do produto. A vacina conjugada proteína de tétanofosfato de poliribosilribitol (PRP-T) utiliza a aperfeiçoada química para ligar de modo covalente o polissacarídeo Hib ao toxóide do tétano (ver Tabela 1).

[009]A vacina conjugada mutante toxóide da difteria de reação cruzada com fosfato de poliribosilribitol (PRP-CRM), também referida como conjugado *Haemophilus b* oligossacarídeo (HbOC), não contém Hib PS. Em lugar disso, ela utiliza oligossacarídeos de cerca de 20 unidades de repetição derivadas pela oxidação de periodato da funcionalidade glicol na fração ribitol. Os oligossacarídeos oxidados são em seguida ligados diretamente a CRM<sub>197</sub> uma forma mutante não tóxica da toxina da difteria isolada a partir de culturas de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β197), em presença de cianoboroidrato de sódio (aminação redutora). Ver Anderson e outros, J. Immunol. 1989; 142: 2464-8; e Andereson, Infect. Immun. 1983, 39: 233-238. Nesse método de conjugação, a relação de oligossacarídeo para proteína foi descoberta ser crítica para a resposta anticorpo ótima. Ver Knistern e outros, "Conjugation: design, chemistry, and analysis" em Ellis e outros, Development and clinical uses of

*Haemophilus b* conjugate vaccines. New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69; Anderson e outros, J. Immunol. 1989, 142: 2464-8.

[0010]Comparado a outras vacinas Hib conjugadas, a vacina conjugada complexa Hib polissacarídeo-proteína da membrana externa de *Neisseria meningitidis* (PRP-OMPC) tem um número de propriedades únicas. O carreador proteína não é um componente da vacina da difteria, tétano, e coqueluche (DTP), mas consiste de vesículas da membrana externa meningocócicas depletadas de lipopolissacarídeos os quais são ligados Hib PS de tamanho reduzido através de uma ligação tioéter. Ver Marburg e outros, J. Amer. Chem. Soc. 1986; 108: 5282-5287; Kniskern e outros, "Conjugation : design, chemistry, and analysis" em Ellis e outros, Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines. New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69; Anderson e outros, J. Immunol. 1989; 142: 2464-8. Nesses processos, ligantes separados são ligados a ambos a proteína e a polissacarídeo Hib, seguido pela fusão dos ligantes para formar uma ligação tioéter.

[0011]*Neisseria meningitidis* é uma causa principal da meningite bacteriana e sepsia no mundo. Os meningocócicos patogênicos são envolvidos por uma cápsula de polissacarídeo que é anexada à superfície externa da membrana do organismo. Treze diferentes sorogrupos de meningocócicos foram identificados com base na especificidade imunológica do polissacarídeo capsular (Frasch, C. E., e outros. 1985). Desses treze sorogrupos, cinco provocam a maioria das doenças meningocócicas; essas 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 provocam a maioria das doenças endêmicas e erupções localizadas. A defesa hospedeira do meningocócico invasivo é dependente da bacteriólise complemento-mediada. Os anticorpos do soro que são responsáveis para a bacteriólise complemento-mediada são direcionados em grande parte contra o polissacarídeo capsular externo.

[0012]As vacinas convencionais baseadas no polissacarídeo meningocócico

eliciam uma imuno-resposta contra o polissacarídeo capsular. Esses anticorpos são capazes da bacteriólise complemento-mediada do sorogrupo meningocócico específico. As vacinas polissacarídeo meningocócicas são mostradas serem eficazes em crianças e adultos. Todavia, a eficácia foi limitada em bebês e em crianças jovens, e doses subsequentes do polissacarídeo em populações mais jovens eliciaram uma resposta fraca ou não estimulante.

[0013] Existe um número de abordagens que pode ser empregada para a ativação do PS meningocócico e para a conjugação, como sumariado na Tabela 2. Cada modo de ativação tem o potencial de alterar importantes epítomos, mesmo quando relativamente poucos sítios estão ativados sobre a molécula do PS. A ativação do periodato do PS meningocócico do grupo C, por exemplo, resulta na quebra da cadeia gerando unidades de sacarídeos menores com grupos aldeído terminais que podem ser ligados à proteína por meio de aminação redutora. Richmond e outros, J. Infect. Dis. 1999; 179: 1569-72.

Tabela 2

| Método                    | Tamanho do sacarídeo | Proteína carreadora | Espaçador | Procedimento                                                                      | Usado em humanos |
|---------------------------|----------------------|---------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| #1 amina-<br>ção redutora | Reduzido             | Toxóide do tétano   | Nenhum    | Forma aldeído do PS combinado com proteína na presença de cianoborodrato de sódio | Não              |
| #2 carbo-<br>diimida      | Nativa               | Toxóide do tétano   | Nenhum    | PS e proteína combinados em presença de carbodiimida, em seguida bloque-          | Não              |

|                             |                        |                    |               |                                                                                                               |     |
|-----------------------------|------------------------|--------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|                             |                        |                    |               | ado com etanolamina                                                                                           |     |
| #3 éster ativo <sup>a</sup> | Oligossacarídeo        | CRM <sub>197</sub> | ácido adípico | Terminal redutor aminado do oligossacarídeo conjugado à proteína por meio de ácido adípico (NHS) <sub>2</sub> | Sim |
| #4 amina-ção redutora       | Reduzido               | CRM <sub>197</sub> | Nenhum        | Forma aldeído do sacarídeo combinado com proteína na presença de cianoboroidrato de sódio                     | Sim |
| #5 amina-ção redutora       | De-OAc PS <sup>b</sup> | Toxóide do tétano  | Nenhum        | Forma aldeído do PS combinado com proteína na presença de cianoboroidrato de sódio                            | Sim |

<sup>a</sup> diéster de N-hidroxisuccinimida do ácido adípico

<sup>b</sup> PS diacetilada reportada apenas para Meningocócico grupo C

[0014]Estudos iniciais acerca da produção e da otimização de conjugados meningocócicos do grupo C foram reportados bem antes da comercialização dos conjugados Hib. Ver Beuvery e outros, Infect. Immun. 1982; 37: 15-22; Beuvery e outros, Infect. Immun. 1983; 40: 39-45; Beuvery e outros, J. Infect. 1983 ; 6: 247-55; Jennings, e outros, J. Immunol. 1981; 127 : 1011-8.

[0015]Duas diferentes metodologias de conjugação foram reportadas para a ligação química do PS do grupo C a um carreador proteína. Ver Jennings e outros, J.

Immunol. 1981; 127: 1011-8 ; Beuvery e outros, Infect. Immun. 1983 ; 40: 39-45. A primeira abordagem emprega PS parcialmente despolimerizado, o qual é ativado mediante a criação de grupos aldeído terminais ao longo da oxidação periodato (Método #1 na Tabela 2). Os aldeídos são em seguida reagidos através de aminação redutora combinados com grupos amino livres sobre a proteína, em sua maioria lisinas, na presença de cianoboroidrato de sódio. Ver Jennings e outros , J Immunol 1981 ; 127: 1011-8. Nesse método, a ativação ocorre em um sítio específico sobre o PS do grupo C.

[0016]A segunda abordagem utiliza a reação carbodiimida (Método #2 na Tabela 2) para ligar de modo covalente os grupos carboxílicos na PS de alto peso molecular aos grupos  $\epsilon$ -amino lisina sobre a proteína carreadora. Os sítios de ativação nesse método são mais aleatórios, comparados à ativação do periodato.

[0017]Os conjugados meningocócicos do Grupo C preparados por meio desses dois métodos foram avaliados em animais. Ver Beuvery e outros , Dev. Biol. Stand. 1986; 65: 197-204; e Beuvery e outros , J. Infect. 1983; 6: 247-55. Os conjugados estimularam ambas as respostas célula-T independentes e célula-T dependente sob imunização inicial. Ver Beuvery e outros, J. Infect. 1983; 6: 247-55. Estudos têm mostrados que o PS precisa, todavia, estar ligado de modo covalente à proteína carreadora para induzir uma resposta anticorpo célula-T dependente.

[0018]Os primeiros conjugados meningocócicos grupo A e grupo B a serem usados em ensaios clínicos foram preparados por Chiron Vaccines e foram reportados em 1992 (Método #3 na Table 2). Ver Costantino e outros, Vaccine 1992; 10 : 691-8. O método de conjugação foi baseado na ativação seletiva do grupo terminal de oligossacarídeos pequenos produzidos por hidrólise ácida branda seguida por acoplamento a uma proteína através de um espaçador hidrocarboneto. O mutante não-tóxico da toxina da difteria, CRM<sub>197</sub>, foi usado como o carreador proteína. Para ativar os oligossacarídeos para conjugação, um grupo amino foi acrescentado ao

final do oligossacarídeo, e em seguida reagido com diéster N-hidroxisuccinimida do ácido adípico para criar um éster ativo. Esse éster ativo foi em seguida ligado de modo covalente aos grupos  $\epsilon$ -amino lisina na proteína CRM<sub>197</sub>, criando o conjugado.

#### Sumário da Invenção

[0019] Métodos convencionais para a preparação de vacinas conjugadas PS-proteína não utilizam a química hidrazida na reação de conjugação de aminação redutora, ainda que hidrazida na forma de ADH têm sido usada na ativação do polissacarídeo. Esses métodos da técnica já existentes utilizam grupos  $\epsilon$ -amino dos radicais lisina sobre a proteína para reagir com os grupos funcionais sobre os PSs ativados, tais como grupos aldeído (aminação redutora) e grupos carboxílicos. A eficiência da reação é baixa, tipicamente apenas cerca de 20%. A reação também requer dois ou três dias para a conjugação ser completada, necessitando o uso de etapas de purificação para separar o conjugado do PS não reagido. Ver Guo e outros, "Protein-polysaccharide conjugation" em: Pollard e outros, *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 66: Meningococcal Vaccines: methods and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 2001, pg 49-54. Existe um número de explicações que foram propostas para os baixos rendimentos observados. Primeira o grupo  $\epsilon$ -amino lisina ( $pK_a = 10,5$ ) possui baixa reatividade nas condições de conjugação ( $pH\ 6,5-7,4$ ). Ver Inman e outros, *Biochemistry* 1969; 8: 4074-4082. Em segundo lugar, a maioria dos métodos de conjugação empregam toxóides como as proteínas carreadoras. Os toxóides são derivados a partir de uma toxina mediante a destoxificação com formaldeído, os quais se combinam com os grupos amino da toxina, deixando números limitados de grupos amino disponíveis para a conjugação. Terceiro, a reduzida solubilidade da proteína ativada resultante e do conjugado PS-proteína pode ser levada à precipitação.

[0020] Consequentemente, métodos para a síntese e a fabricação de vacinas conjugadas polissacarídeo-proteína de altos rendimentos são desejáveis. Também

desejáveis são métodos onde a reação procede a uma velocidade rápida, com reduzida produção de subprodutos indesejados, e com reduzidas quantidades de proteína e polissacarídeos não reagidos remanescentes ao final da reação.

[0021]As vacinas existentes com base nos PSs são de uso limitado em crianças jovens e não proporcionam proteção de longa duração em adultos. Desse modo, existe uma necessidade quanto a uma vacina conjugada proteína-PS capaz de conferir proteção de longo prazo contra doenças em crianças e adultos em risco quanto a, por ex., meningite bacteriana, gripe, tétano, e outras infecções bacterianas. Os conjugados proteína-PS da modalidade preferida podem ser empregados para preparar formulações de vacina capazes de conferir proteção de longo prazo para bebês, crianças, e adultos.

[0022]Consequentemente, em uma primeira modalidade, é provido um método para a preparação de uma vacina conjugada, o método compreendendo reagir um polissacarídeo com um agente oxidante, por meio do qual uma solução de um polissacarídeo aldeído-ativado é obtida; trocar o tamponamento da solução do polissacarídeo aldeído-ativado para um pH de a partir de cerca de 7 até cerca de 8; reagir uma proteína com hidrazina ou diidrazida de ácido adípico em presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida a um pH de a partir de cerca de 6 até cerca de 7, por meio do qual uma solução de uma proteína hidrazida-ativada é obtida; elevar um pH da solução da proteína hidrazida-ativada para a partir de cerca de 7,0 até cerca de 11; trocar o tamponamento da solução da proteína hidrazida-ativada para um pH de a partir de cerca de 10,0 até cerca de 11,0; reagir o polissacarídeo aldeído-ativado com a proteína hidrazida-ativada a um pH de a partir de cerca de 6 até cerca de 8, por meio de qual um conjugado compreendendo uma ou mais duplas ligações C=N é obtida; e reduzir substancialmente a totalidade das duplas ligações C=N do conjugado para ligações simples C-N, por meio do qual uma vacina conjugada capaz de estimular uma imuno-resposta é obtida.

[0023]Em um aspecto da primeira modalidade, o agente oxidante compreende  $\text{NaIO}_4$ .

[0024]Em um aspecto da primeira modalidade, a solução do polissacarídeo aldeído-ativado é alterada em tampão com um tampão HEPES.

[0025]Em um aspecto da primeira modalidade, a solução da proteína hidrazida-ativada é alterada em tampão com um tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

[0026]Em um aspecto da primeira modalidade, o polissacarídeo aldeído-ativado é reagido com a proteína hidrazida-ativada a uma relação de a partir de cerca de 1:2 até cerca de 2:1.

[0027]Em um aspecto da primeira modalidade, redução compreende reduzir com  $\text{NaBH}_4$ .

[0028]Em um aspecto da primeira modalidade, o polissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos Meningocócicos, polissacarídeos Pneumocócicos, polissacarídeo *Hemophilus influenzae tipo b*, polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, e polissacarídeos Streptococcus do grupo B.

[0029]Em um aspecto da primeira modalidade, a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM<sub>197</sub>, e proteína meningocócica.

[0030]Em uma segunda modalidade, um método para a preparação de uma vacina conjugada é provido o método compreendendo reagir um polissacarídeo com tetrafluorborato de 1-ciano-4-dimetilamonipiridínio, por meio do qual uma solução de polissacarídeo cianato-ativado é obtida; reagir uma proteína com hidrazina ou diidrazida do ácido adípico na presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida a um pH de a partir de cerca de 6 até cerca de 7, por meio do qual uma solução de uma proteína hidrazida-ativada é obtida; elevar o pH da solução da proteína hidrazida-ativada para a partir de cerca de 7,0 até cerca de 11; trocar o tamponamento da solução da proteína hidrazida-ativada para um pH de a partir de

cerca de 10,0 até cerca de 11,0; reagir o polissacarídeo cianato-ativado com a proteína hidrazida-ativada a um pH de a partir de cerca de 6 até cerca de 8 para produzir uma vacina conjugada capaz de estimular uma imuno-resposta.

[0031]Em um aspecto da segunda modalidade a etapa de reagir o polissacarídeo cianato-ativado com a proteína hidrazida-ativada é conduzida em ausência de um agente de bloqueio.

[0032]Em um aspecto da segunda modalidade, o polissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos Meningocócicos, polissacarídeos Pneumocócicos, polissacarídeo *Hemophilus influenzae tipo b*, polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, e polissacarídeo Streptococcus do grupo B.

[0033]Em um aspecto da segunda modalidade, a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM<sub>197</sub>, e proteína meningocócica.

[0034]Em uma terceira modalidade, um método para a preparação de uma vacina conjugada é provido, o método compreendendo reagir uma proteína com 1-amino-2,3-propanodiol (APDO) na presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida a um pH de a partir de cerca de 6 até cerca de 7, por meio do qual uma solução de uma proteína APDO-modificada é obtida; trocar o tamponamento da solução da proteína APDO-modificada para um pH de a partir de cerca de 10,0 até cerca de 11,0; reagir a proteína APDO-modificada com um agente oxidante, por meio do qual uma solução de uma proteína aldeído-ativada é obtida; trocar o tamponamento da solução da proteína aldeído-ativada para um pH de a partir de cerca de 10,0 até cerca de 11,0; reagir uma polissacarídeo hidrazida-ativado com a proteína aldeído-ativada a um pH de a partir de cerca de 6 até cerca de 8, por meio do qual um conjugado compreendendo uma ou mais duplas ligações C=N é obtido; e reduzir substancialmente a totalidade das duplas ligações C=N do conjugado para ligações simples C-N, por meio do qual uma vacina conjugada capaz

de estimular uma imuno-resposta é obtida.

[0035]Em um aspecto da terceira modalidade, o polissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos Meningocócicos, polissacarídeos Pneumocócicos, polissacarídeo *Hemophilus influenzae tipo b*, polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, e polissacarídeos Streptococcus do grupo B.

[0036]Em um aspecto da terceira modalidade, a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM<sub>197</sub>, e proteína meningocócica.

[0037]Em um aspecto da terceira modalidade, o polissacarídeo hidrazida-ativado é preparado mediante reagir um polissacarídeo com um agente oxidante em uma solução, por meio do qual um polissacarídeo aldeído-ativado é obtido; reagir o polissacarídeo aldeído-ativado com diidrazida do ácido adípico para produzir um intermediário que compreende uma ou mais duplas ligações C=N; e reduzir substancialmente a totalidade das duplas ligações C=N do intermediário para ligações simples C-N, por meio do qual um polissacarídeo hidrazida-ativado é obtido.

[0038]Em um aspecto da terceira modalidade, o polissacarídeo hidrazida-ativado é preparado mediante reagir um polissacarídeo com tetrafluorborato de 1-ciano-4-dimetilamonipiridínio, por meio do qual um polissacarídeo cianato-funcionalizado é obtido; reagir o polissacarídeo cianato-funcionalizado com diidrazida do ácido adípico, por meio do qual um polissacarídeo hidrazida-ativado é obtido.

[0039]Em um aspecto da terceira modalidade, o polissacarídeo hidrazida-ativado é preparado mediante reagir um polissacarídeo com diidrazida do ácido adípico na presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida, por meio do qual um polissacarídeo hidrazida-ativado é obtido.

[0040]Em uma quarta modalidade, uma vacina conjugada é provida, a vacina conjugada compreendendo pelo menos uma fração de polissacarídeo e pelo menos uma fração de proteína, onde a fração de polissacarídeo está ligada à fração de

proteína através de pelo menos um grupo ligante de fórmula  $-C(=O)-NH-NH-CH_2-$ .

[0041]Em um aspecto da quarta modalidade, a vacina conjugada compreende uma pluralidade de frações de polissacarídeos e uma pluralidade de frações de proteína reticuladas para formar uma estrutura entrelaçada por meio de uma pluralidade de grupos ligantes.

[0042]Em um aspecto da quarta modalidade, o polissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeo Meningocócicos, polissacarídeos Pneumocócicos, polissacarídeo *Hemophilus influenzae tipo b*, polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, e polissacarídeos Streptococcus do grupo B.

[0043]Em um aspecto da quarta modalidade, a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM<sub>197</sub>, e proteína meningocócica.

[0044]Em uma quinta modalidade, é provida uma vacina conjugada, a vacina conjugada compreendendo pelo menos uma fração de polissacarídeo e pelo menos uma fração de proteína, onde a fração de polissacarídeo está ligada à fração de proteína através de pelo menos um grupo ligante de fórmula  $-C(=O)-NH-NH-C(=NH)-O-$ .

[0045]Em um aspecto da quinta modalidade, a vacina conjugada compreende uma pluralidade de frações de polissacarídeo e uma pluralidade de frações de proteína reticuladas para formar uma estrutura entrelaçada por meio de uma pluralidade de grupos ligantes.

[0046]Em um aspecto da quinta modalidade, o polissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos Meningocócicos, polissacarídeos Pneumocócicos, polissacarídeo *Hemophilus influenzae tipo b*, polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, e polissacarídeos Streptococcus do grupo B.

[0047]Em um aspecto da quinta modalidade, a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM<sub>197</sub>, e proteína meningocócica.

[0048]Em uma sexta modalidade, uma vacina conjugada é provida, a vacina conjugada compreendendo pelo menos uma fração de polissacarídeo e pelo menos uma fração de proteína, onde a fração de polissacarídeo está ligada à fração de proteína através de pelo menos um grupo ligante de fórmula  $-C(=O)-NH-CH_2-CH_2-NH-NH-$ .

[0049]Em um aspecto da sexta modalidade, a vacina conjugada compreende uma pluralidade de frações de polissacarídeo e uma pluralidade de frações de proteína reticuladas para formar uma estrutura entrelaçada por meio de uma pluralidade de grupos ligantes.

[0050]Em um aspecto da sexta modalidade, o polissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos Meningocócicos, polissacarídeos Pneumocócicos, polissacarídeo *Hemophilus influenzae tipo b*, polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, e polissacarídeos Streptococcus do grupo B.

[0051]Em um aspecto da sexta modalidade, a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM<sub>197</sub>, e proteína meningocócica.

#### Breve Descrição dos Desenhos

[0052]A Figura 1 proporciona um espectro de produtos da conjugação de polissacarídeo meningocócico do grupo C periodato-ativado para a) grupos  $\epsilon$ -amino sobre lisinas (TT) (método convencional), e b) grupos hidrazina sobre radicais ácido aspártico e glutâmico (TT-H). Os espectros são tomados a partir de produtos de conjugação antes da etapa de diálise e contêm picos extras maiores que 25 minutos não observados após a diálise. A produção do conjugado (Conj.) é muito maior para TTH que para TT.

[0053]A Figura 2 proporciona perfis de cromatografia de exclusão dimensional de alta performance (HPSEC) de conjugados PS-TT Pn 18C preparados mediante conjugação por cianilação na ausência e presença de um agente de bloqueio

ADH, hidrazina, glicina ou etanolamina. O pico conjugado (Conj., 15,5 minutos) é reduzido significativamente na presença de um agente de bloqueio enquanto que o pico da proteína livre (22 minutos) não é. Os espectros são tomados a partir de produtos de conjugação antes da etapa de diálise e contêm picos extras em maiores que 25 minutos não percebidos após a diálise.

[0054]A Figura 3 proporciona perfis HPSEC de quatro conjugados PS-TT Mn C preparados por meio da conjugação de aminaç o redutora de PS alde do-ativado e prote na hidrazida-ativada. Os perfis HPSEC se deslocam ligeiramente em momentos diferente. O ombro direito a 22,5-24 minutos   proveniente da prote na TTH ou TTADH n o conjugadas, enquanto que o ombro esquerdo a 16-17 minutos   proveniente de conjugado de alto peso molecular.

[0055]A Figura 4 proporciona uma avalia  o do polissacar deo livre em um produto conjugado PS-TT Mn C preparado mediante conjug  o por amina  o redutora do PS alde do-ativado e prote na hidrazida-ativada. A Figura 4A proporciona perfis HPSEC de um conjugado PS-TT Mn C pr  (3) e p s (1) absor  o C18, e TTH puro (2) monitorados a 280 nm, detectando prote na. A completa absor  o das esp cies prote na por meio de C18 a partir do produto conjugado   mostrada no perfil (1). A Figura 4B proporciona perfis HPSEC das mesmas tr s inje  es como na Figura 4A monitorados a 206 nm, detectando prote na e polissacar deo. O pico a 22,5 minutos na p s absor  o C18 (1)   proveniente do polissacar deo livre n o absorvido no produto conjugado. A Figura 4C proporciona uma compara  o do perfil HPSEC a 206 nm do PS livre no produto conjugado (1) com aquele do PS Mn C ativado a 0,033 mg/mL (2), 0,067 mg/mL (3), e 0,134 mg/mL (4).

[0056]A Figura 5 proporciona uma quantifica  o do PS livre no conjugado Mn C PS-TT preparado mediante conjug  o por amina  o redutora de PS alde do-ativado e prote na hidrazida-ativada. A  rea do pico a 22,5 minutos em perfis HPSEC 2, 3 e 4 na Figura 4C   medida e marcada em gr fico contra sua respectiva

concentração para construir uma curva padrão. O teor de PS livre no produto conjugado é calculado a partir da área de pico a 22,5 minutos do perfil 1 na Figura 4C.

[0057]A Figura 6 proporciona perfis HPSEC (280 nm) de um conjugado PS-TT Mn A MA031219R preparado por meio de conjugação por aminação redutora de PS aldeído-ativado e proteína hidrazida-ativada, e TTH usando uma coluna Waters Ultrahydrogel Linear. Sob conjugação, o sinal da proteína se desloca de 17,5 minutos para 15 minutos.

[0058]A Figura 7 proporciona perfis HPSEC profiles (280 nm) de conjugado PS-TT Pn 6B preparado por meio de conjugação por cianilação e TTH usando uma coluna Waters Ultrahydrogel Linear. Sob conjugação, o sinal da proteína se desloca de 17 minutos para 13,5 minutos. Os espectros são tomados a partir dos produtos de conjugação antes da etapa de diálise e contêm picos extras em mais que 25 minutos não observados após a diálise.

[0059]A Figura 8 proporciona perfis HPSEC (280 nm) de conjugado PS-TT Pn 7F preparado através de conjugação por cianilação. Quando da conjugação, o sinal da proteína se desloca de 17 minutos para 13,5 minutos. Os espectros são tomados a partir dos produtos de conjugação antes da etapa de diálise e contêm picos extras em mais que 25 minutos não vistos após a diálise.

[0060]A Figura 9 proporciona perfis HPSEC (280 nm) de conjugado PS-TT Pn 9V preparado através de conjugação por aminação redutora de PS hidrazida-ativado e proteína aldeído-ativada TT-aldeído. Sob conjugação, o sinal da proteína se desloca de 17 minutos a 13,5 minutos.

#### Descrição Detalhada da Modalidade Preferida

[0061]A descrição e os exemplos a seguir ilustram uma modalidade preferida da presente invenção em detalhes. Aqueles versados na técnica identificam que existem numerosas variações e modificações dessa invenção que estão abrangidas por seu escopo. Consequentemente, a descrição de uma modalidade preferida não

deverá ser considerada a limitar o escopo da presente invenção.

### Introdução

[0062] Os métodos convencionais para a síntese e a fabricação de vacinas conjugadas polissacarídeo-proteína empregam tipicamente reações de conjugação com baixa eficiência (tipicamente em torno de 20%). Isso significa que até 80% do polissacarídeo ativado adicionado é perdido. Em adição, um processo cromatográfico para a purificação dos conjugados provenientes de PS não conjugado é tipicamente necessário. Os métodos sintéticos das modalidades preferidas utilizam as propriedades químicas características dos grupos hidrazida sobre um reagente para reagir com grupos aldeído ou ésteres cianato no outro reagente com um aperfeiçoado rendimento de conjugado (tipicamente tão alto quanto 60%).

[0063] Quando a reação de conjugação procede com uma maior eficiência de conjugação, as quantidades de proteína e de polissacarídeo não conjugados remanescentes após a reação podem ser suficientemente baixas de modo a tornar sua remoção desnecessária. Consequentemente, o processo de purificação do produto conjugado pode ser simplificado para, por exemplo, uma etapa de diafiltração para a remoção de subprodutos de molécula pequena. A reação de conjugação hidrazida-baseada pode ser realizada até o término dentro de um ou dois dias das concentrações dos reagentes de a partir de cerca de 1 até cerca de 40 mg/mL em relações molares PS/proteína de a partir de cerca de 1:5 até cerca de 5:1, preferivelmente de a partir de cerca de 1:2 até cerca de 2:1, e mais preferivelmente em torno de 1:1, embora em certas modalidades relações superiores ou inferiores possam ser preferidas. A reação de conjugação é conduzida preferivelmente em temperaturas de a partir de cerca de 4 °C até cerca de 40 °C, preferivelmente de a partir de cerca de 5, 10, 15, ou 20 °C até cerca de 25, 30, ou 35 °C, e a um pH de a partir de cerca de 6 até cerca de 8,5, preferivelmente de a partir de cerca de 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, ou 6,5 até 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 polissacarídeo. Consequentemente, a vacina conjugada pode ser fabricada a custos inferiores quando uma reação de conjugação hidrazida-baseada é empregada.

[0064] Para superar certas desvantagens dos métodos convencionais para a síntese de vacinas conjugadas, um método para a conjugação de PSs a proteínas carregadoras usando a química hidrazida nas reações de aminação redutora e de conjugação por cianilação é provido. Grupos hidrazida possuindo a estrutura -NH-NH<sub>2</sub> são introduzidos por sobre os grupos carboxílicos dos radicais ácido aspártico e/ou glutâmico de moléculas de proteína por meio de reação carbodiimida com hidrazina, ADH, carbohidrazida, ou diidrato de succinila. A proteína ativada é mantida solúvel a um pH de a partir de cerca de 10 até cerca de 11,5, preferivelmente, de a partir de cerca de 10,1, 10,2, 10,3, ou 10,4 até cerca de 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,0, 11,1, 11,2, 11,3, ou 11,4, e mais preferivelmente de cerca de 10,5, com um tampão a uma concentração de a partir de cerca de 3 ou menos até cerca de 10 mM ou mais, preferivelmente de a partir de cerca de 4 ou 5 mM até cerca de 6, 7, 8, ou 9 mM, antes da conjugação. Tampões adequados incluem, mas não estão limitados a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ácido 3-(cicloexilamino)-1-propanosulfônico (CAPS), e ácido (2-(N-cicloexilamino)etano sulfônico (CHES). A proteína ativada é em seguida reagida com polissacarídeo ativado contendo ou grupos aldeído (aminação redutora) ou grupos cianato (conjugação por cianilação) a um pH de a partir de cerca de 6 até cerca de 8,5, preferivelmente de a partir de cerca de 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, ou 6,5 até 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 até cerca de 200 mM, preferivelmente de a partir de cerca de 110, 120, 130, 140 ou 150 mM até cerca de 160, 170, 180 ou 190 mM. Tampões adequados incluem, mas não estão limitados a, ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfônico) (HEPES), solução salina tamponada em fosfato (PBS), TES, (EDTA, Tris-HCl, SDS), ácido morfolinopropanosul-

fônico (MOPS), e ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES).

[0065]Alternativamente, o PS pode ser funcionalizado com grupos hidrazida. O PS ativado pode ser conjugado, a pH 6,5-7,5 com um tampão forte, para ativar proteínas contendo grupos aldeído (aminação redutora). A proteína é mantida solúvel a um pH de cerca de 10,5 com um tampão fraco até o ponto de conjugação. Devido à maior reatividade dos grupos hidrazida ( $pK_a \approx 2,6$ ) comparada ao grupo  $\epsilon$ -amino lisina ( $pK_a \approx 10,5$ ) nas condições ácidas neutra/branda, e a melhorada solubilidade do conjugado usando a proteína ativada mantida solúvel em cerca de pH 10,5 antes da conjugação, o rendimento da reação de conjugação é grandemente aumentado. A maior reatividade do toxóide do tétano hidrazida-ativado (TT-H) comparada ao toxóide do tétano (TT) é ilustrada na Figura 1.

[0066]Conjugados preparados através desses métodos são imunogênicos nos animais experimentais, como demonstrado nos experimentos em ratos. Em adição, a reação de conjugação pode ser realizada de modo eficiente sem cianoborotrihidrato de sódio, evitando desse modo a introdução de íon cianeto no produto conjugado. A reação pode ser conduzida sob condições de pH ácido brando ou neutro na temperatura ambiente, ou a 4 °C de um dia para o outro como em oposição a dias para os métodos convencionais de conjugação por aaminação redutora. Isso novamente assegura a produção de vacina conjugada de alto rendimento para polissacarídeos instáveis, tais como aquelas provenientes de *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* tipo 19F e *Neisseria meningitidis* grupo A. Os métodos das modalidades preferidas podem ser empregados para produzir vacinas conjugadas menos dispendiosas, promovendo desse modo grandemente a saúde pública.

#### O Polissacarídeo

[0067]O termo “polissacarídeo” como usado aqui, é um termo amplo e é usado em seu senso usual, que inclui, sem limitação, sacarídeos compreendendo uma pluralidade de unidades de repetição, que incluem, mas não estão limitadas a,

polissacarídeos possuindo 50 ou mais unidades de repetição, e oligossacarídeos possuindo 50 ou menos unidades de repetição. Tipicamente, os polissacarídeos possuem de a partir de cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, ou 95 unidades de repetição até cerca de 2000 ou mais unidades de repetição, e preferivelmente de a partir de cerca de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 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. Tipicamente, oligossacarídeos de a partir de cerca 6, 7, 8, 9, ou 10 unidades de repetição até cerca de 15, 20, 25, 30, ou 35 até cerca de 40 ou 45 unidades de repetição.

[0068]Polissacarídeos adequados para uso nas modalidades preferidas incluem polissacarídeos e oligossacarídeos provenientes de bactéria encapsuladas. Os polissacarídeos e oligossacarídeos podem ser provenientes de qualquer fonte, por exemplo, elas podem ser derivadas de bactéria naturalmente ocorrente, bactéria construída geneticamente, ou pode ser produzida sinteticamente. Os polissacarídeos e oligossacarídeos podem ser submetidos a uma ou mais etapas de processamento antes da ativação, por exemplo, purificação, funcionalização, despolimerização usando condições oxidantes brandas, desacetilação, e similar. Etapas de pós-processamento podem ser também empregadas, se desejado. Qualquer método adequado conhecido na técnica para a síntese, preparação, e/ou purificação de polissacarídeos e de oligossacarídeos adequados podem ser empregados.

[0069]Os polissacarídeos e oligossacarídeos para uso nas modalidades preferidas incluem polissacarídeos pneumocócicos de, por exemplo, sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F; polissacarídeos meningocócicos dos sorotipos A, B, C, W135, e Y, fosfato de poliribosilribitol de polissacarídeo *Haemophilus influenza* tipo b, polissacarídeos estreptocócicos grupo B de sorotipos III e V e polissacarídeo de *Salmonella typhi* Vi. Outros polissacarídeos de sorotipos pneumocócicos e estreptocócicos grupo B, e

sorogrupos meningocócicos são também adequados para uso aqui, como são os outros polissacarídeos T-independentes e antígenos de oligossacarídeo, por exemplo, polissacarídeos ou oligossacarídeos derivados a partir de *streptococcus* grupo A, *Staphylococcus*, *Enteroccus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Bacillus anthracis*. Embora os polissacarídeos e oligossacarídeos bacterianos sejam particularmente preferidos lipopolissacarídeos e lipooligossacarídeos bacterianos gram(-) e seus derivados polissacarídeos e oligossacarídeos podem ser também empregados.

[0070]Polissacarídeos com cadeias laterais fosforosas e/ou cadeia estrutural fosforosa são adequadas para uso nas modalidades preferidas. As reações de conjugação das modalidades preferidas são particularmente bem adequadas para uso com polissacarídeos que possuem cadeia estrutural fosforosa. Tais polissacarídeos são sensíveis à fragmentação e degradação, de modo que a rapidez da reação de conjugação resulta em um conjugado de maior qualidade devido ao reduzido tempo durante o qual a degradação pode ocorrer.

[0071]Após o término de qualquer etapa de pré-processamento, o polissacarídeo ou o oligossacarídeo é submetido a uma etapa de “ativação”. O termo “ativação” se refere a um tratamento químico do polissacarídeo para prover grupos químicos capazes de reagir com a proteína. Em uma modalidade particularmente preferida, a ativação envolve a funcionalização do polissacarídeo ou oligossacarídeo com grupos hidrazida que são reagidos com grupos aldeído em uma proteína funcionalizada. De modo alternativo, o polissacarídeo ou oligossacarídeo pode ser funcionalizado com grupos aldeído, grupos cetona, ou grupos cianato que são reagidos com os grupos hidrazida em uma proteína funcionalizada.

[0072]Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar o polissacarídeo ou o oligossacarídeo com grupos hidrazida. Uma reação preferida de funcionalização é a aminação redutora, onde o polissacarídeo ou o oli-

gossacarídeo é reagido com  $\text{NaIO}_4$  em uma reação periodato de ativação para produzir grupos aldeído, os quais são em seguida reagidos com diidrazida de ácido adípico, seguido pela subsequente redução com  $\text{NaBH}_4$ . De modo alternativo, uma reação de cianilação pode ser empregada, onde o polissacarídeo ou o oligossacarídeo é reagido com brometo de cianogênicos ou tetrafluorborato de 1-ciano-4-dimetilamonipiridínio para introduzir um grupo cianato o qual é em seguida reagido com diidrazida de ácido adípico. Uma reação carbodiimida pode ser também empregada, onde o polissacarídeo ou o oligossacarídeo é reagido com diidrazida de ácido adípico na presença de cloridrato de 1-(3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida.

[0073]Qualquer reação adequada de funcionalização pode ser empregada para ativar o polissacarídeo ou o oligossacarídeo com grupos cianato. Preferivelmente, o polissacarídeo ou o oligossacarídeo é reagido com tetrafluorborato de 1-ciano-4-dimetilamonipiridínio na presença de trietilamina.

[0074]Qualquer reação adequada de funcionalização pode ser empregada para ativar o polissacarídeo ou o oligossacarídeo com grupos aldeído. Certos polissacarídeos e oligossacarídeos possuem grupos aldeído terminais que podem participar na reação de conjugação. Se o polissacarídeo ou oligossacarídeo é ativado com grupos aldeído, uma reação preferida envolve a reação com um agente oxidante, tal como  $\text{NaIO}_4$ . Agentes oxidantes possuem o potencial para fragmentar o polissacarídeo ou o oligossacarídeo. A fragmentação indesejável pode ser evitada ou controlada mediante a seleção do agente oxidante em particular e concentração do agente oxidante empregado. Grupos cetona são também capazes de reagir com a hidrazida, de modo que a ativação do polissacarídeo ou oligossacarídeo com grupos cetona pode ser empregada em certas modalidades.

[0075]Uma solução de polissacarídeo ativado fortemente tamponada (a pH de a partir de cerca de 6,5 até cerca de 8, com uma alta concentração tamponante de a partir de cerca de 10 mM até cerca de 200 mM) é preferivelmente empregada

na reação de conjugação na forma de uma solução fortemente tamponada. Qualquer tampão adequado pode ser empregado, preferivelmente um tampão tal como N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfônico).

### A Proteína

[0076]O polissacarídeo ou oligossacarídeo ativado é acoplado a uma proteína para produzir uma vacina conjugada. Proteínas adequadas incluem toxinas bacterianas que são carreadores imunologicamente eficazes que foram tornados seguros através de meios químicos ou genéticos para a administração a um indivíduo. Exemplos incluem toxinas bacterianas inativadas tais como toxóide da difteria, CRM197, toxóide do tétano, toxóide da coqueluche, *E.coli* ST, e exotoxina A proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*. Proteínas da membrana externa bacteriana tais como, complexo c da membrana externa (OMPC), proteínas ligantes transferrina, porina, pneumólise, proteína A da superfície pneumocócica, (PspA), proteína adesiva pneumocócica (PsaA), ou proteínas da superfície pneumocócica BVH-3 e BVH-11 podem ser também usadas. Outras proteínas tais como antígenos protetores (PA) de *Bacillus anthracis*, ovalbumina, hemocianina de lapa keyhole (KLH), albumina de soro humano, albumina de soro bovino (BSA) e derivado purificado de proteína de tuberculina (PPD) podem ser também usados. As proteínas são preferivelmente proteínas que são não tóxicas e não reatogênicas e possíveis de serem obtidas em quantidade e pureza suficientes que sejam amigáveis aos métodos de conjugação das modalidades preferidas. Por exemplo, a toxina da difteria pode ser purificada a partir de culturas de *Corinobacteria diphtheriae* e quimicamente destoxificada usando formaldeído para produzir uma proteína adequada.

[0077]Fragmentos de toxinas ou toxóides nativos, que contenham pelo menos um epítipo célula-T, são também úteis, como são os complexos proteína da membrana externa, bem como certos análogos, fragmentos, e/ou fragmentos análogos das várias proteínas listadas acima. As proteínas podem ser obtidas a partir de

fontes naturais, podem ser produzidos por tecnologia recombinante, ou por meio de métodos sintéticos como são conhecidos na técnica. Os análogos podem ser obtidos através de vários métodos, por exemplo, certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos em uma proteína sem apreciável perda da capacidade interativa de ligação com estruturas tais como, por exemplo, regiões antígeno-ligantes ou sítios ligantes sobre moléculas do substrato. Outras proteínas podem ser também empregadas, tais como aquelas contendo grupos ácido glutâmico ou ácido aspártico exposto na superfície.

[0078]Qualquer reação adequada de funcionalização pode ser empregada para ativar a proteína com grupos hidrazida. Métodos convencionais para a preparação de proteínas hidrazida-modificadas incluem catálise EDC e um processo em duas etapas usando iodoacetato de N-succinimidila e tiol hidrazida através de grupos  $\epsilon$ -amino lisina da proteína. Ver King e outros, *Biochemistry* 1986; 25: 5774-5779. Proteína modificada preparada por catálise EDC necessita tipicamente ser fracionada a fim dela ser adequada para uso na conjugação, e o processo em duas etapas é trabalhoso. Consequentemente, é geralmente não preferido empregar tais métodos para a preparação da proteína hidrazida-modificada. Todavia, em certas modalidades, tais métodos podem ser aceitáveis ou mesmo desejáveis.

[0079]Preferivelmente, os grupos hidrazida são introduzidos dentro das proteínas através de grupos carboxílicos de radicais de ácido aspártico e ácido glutâmico na proteína usando uma reação carbodiimida, por exemplo, mediante reação com hidrazina, carbodiidrazida, diidrazida de succinila, diidrazida de ácido adípico, ou quaisquer outras diidrazidas na presença de EDC. EDC é empregado como um catalisador para ativar e modificar a proteína reagente com a hidrazina ou a diidrazida. Qualquer carbodiimida solúvel em água incluindo EDC pode ser usada como um catalisador. Proteínas EDC-catalisadas possuem geralmente uma tendência para polimerizar e precipitar, e desse modo não são geralmente preferidas para a prepa-

ração de conjugados envolvidos com proteína. Ver Schneerson e outros , Infect. Immun. 1986,52 : 519-528; Shafer e outros, Vaccine 2000 ; 18 (13): 1273-1281; and Inman e outros , Biochemistry 1969; 8: 4074-4082. A agregação e a precipitação da proteína ativada depende, em parte, de seu pH ambiental. Consequentemente, a tendência a polimerizar e precipitar pode ser controlada mediante manter tais proteínas hidrazida-modificadas solúveis em uma solução tamponada. Mediante a troca do tamponamento da mistura reacional de modo a manter a proteína ativada a um pH de cerca de 10,5, a proteína ativada se mantém solúvel e estável para a conjugação. Qualquer tampão adequado pode ser empregado. Preferivelmente um tampão fraco tal como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a uma baixa concentração de a partir de cerca de 3 mM até cerca de 10 mM é empregado.

[0080]A proteína hidrazida-modificada tamponada pode ser então empregada na preparação de conjugados proteína-polissacarídeo sem precipitação quando adicionado o polissacarídeo ativado a um pH de a partir de cerca de 6 a 8,5, preferivelmente de a partir de cerca de 6,5 até cerca de 8. Qualquer reação adequada de funcionalização pode ser empregada para ativar a proteína com grupos aldeído. Preferivelmente, a proteína é reagida com 1-amino-2,3-propanodiol na presença de EDC. Amino açúcares tais como glicosamina, galactosamina, e similar podem ser usados no lugar do 1-amino-2,3-propanodiol. Nessa reação, EDC é também empregado como um catalisador para ativar e modificar a proteína reagente com o aminodiol através dos grupos carboxílicos dos radicais de ácido aspártico e de ácido glutâmico da proteína.

#### Preparação de Conjugados ou Aminoação Redutora

[0081]Os conjugados podem ser preparados mediante a reação de aldeído e grupos hidrazida (aminoação redutora). A reação de conjugação por aminoação redutora pode ser empregada para conjugar um reagente hidrazida-modificado (proteína ou polissacarídeo) ao outro componente contendo grupos aldeído.

[0082]Na aminação redutora convencional, a reação entre aldeído e grupos amino é reversível e desfavorável, tal que cianoboroidreto de sódio é necessário para facilitar a conjugação mediante conversão da dupla ligação C=N a uma ligação simples C-N para tornar reversível o completo evento da aminação redutora. Em contraste, a reação de conjugação por aminação redutora das modalidades preferidas procede sem a ajuda de cianoboroidreto de sódio devido a alta eficiência da reação hidrazida-aldeído. Ao final da reação de conjugação por aminação redutora, boroidreto de sódio ou um outro reagente adequado é empregado para reduzir a dupla ligação C=N a uma ligação simples C-N, bem como para reduzir quaisquer grupos aldeído residuais a grupos álcool. A reação de conjugação por aminação redutora das modalidades preferidas evita a contaminação do conjugado resultante com cianeto, um subproduto do cianoboroidreto de sódio.

[0083]Para reduzir a precipitação da proteína ativada durante a reação de conjugação, a proteína ativada está preferivelmente na forma de uma solução fracamente tamponada com uma baixa concentração de tampão de a partir de cerca de 3 mM até cerca de 10 mM a qual é acrescentada a uma solução de polissacarídeo ativado fortemente tamponada (a pH de a partir de cerca de 6,5 até cerca de 7,5, com uma alta concentração de tampão de a partir de cerca de 100 mM até cerca de 200 mM). Preferivelmente o pH da solução de proteína ativada está tamponado de a partir de cerca de pH 10 até cerca de pH 11,5, mais preferivelmente até cerca de pH 10,5. A solução de polissacarídeo ativado é preferivelmente fortemente tamponada de a partir de cerca de pH 6 até cerca de pH 8, mais preferivelmente de a partir de cerca de pH 6,5 até cerca de pH 7,5. A reação de aminação redutora hidrazida-aldeído procede a uma velocidade rápida, e o efeito de precipitação de um pH inferior a 10,5 (por exemplo, um pH tão baixo quanto de a partir de cerca de 8,5 até cerca de 9,5) sobre a proteína ativada é superado pelas propriedades moleculares do polissacarídeo ativado reagente.

### Preparação de Conjugados por meio de Conjugação por Cianilação

[0084] Os conjugados podem ser preparados mediante a reação de grupos hidrazida e cianato (conjugação por cianilação). A reação de conjugação por cianilação é eficiente e reversível, favorecendo a formação do produto. Em certas modalidades, agentes de bloqueio são empregados para remover grupos cianato residuais. Todavia, a adição de um agente de bloqueio às misturas reacionais direciona a reação de conjugação de volta e reduz o rendimento da conjugação em 5-12%. O efeito dos vários agentes de bloqueio sobre o rendimento foi investigado. O polissacarídeo pneumocócico Pn 18C PS foi ativado com CDAP e em seguida conjugado ao toxóide de tétano hidrazida-ativado (TTH) de um dia para o outro. Cinco alíquotas foram acrescentadas ou com água ou com um agente de bloqueio a 0,2 M. Após 4 horas de incubação, as amostras foram analisadas por HPSEC usando uma coluna Waters Ultrahydrogel 2000 com um monitor a 280 nm (Figura 2). O rendimento da conjugação de cada amostra, provido na Tabela 3, foi determinado como o % de área do pico conjugado a 15,5 minutos sobre a proteína total, isto é, pico do conjugado mais o pico livre de TTH (a 22 minutos). Embora em certas modalidades seja desejável empregar agentes de bloqueio para inativar rapidamente os grupos cianato residuais remanescentes, é geralmente preferido evitar o uso deles de modo a evitar a redução no rendimento do conjugado.

Tabela 3

| Agente de bloqueio<br>(0,2 M) | Rendimento de<br>conjugação | % Controle | % redução |
|-------------------------------|-----------------------------|------------|-----------|
| Nenhum (Controle)             | 75                          | 100        | 0         |
| ADH                           | 63                          | 84         | 16        |
| Hidrazina                     | 70                          | 93         | 7         |
| Glicina                       | 66                          | 89         | 11        |
| etanolamina                   | 65                          | 87         | 13        |

[0085] Para remover os grupos cianato residuais no produto de conjugação sem utilizar um agente de bloqueio, o tempo de conjugação pode ser prolongado. Preferivelmente, a conjugação é conduzida a uma temperatura de a partir de cerca de 0 °C até cerca de 5 °C por cerca de 36 a 48 horas, mais preferivelmente de cerca de 4 °C por cerca de 36 horas, seguido por cerca de um adicional de 18 a 24 horas a uma temperatura de a partir de cerca de 20 °C até cerca de 25 °C, mais preferivelmente de cerca de 18 horas a cerca de 20 a 24 °C, tal que os grupos cianato residuais reajam com a água e se decomponham. Tempos de conjugação menores ou maiores e/ou temperaturas de conjugação inferiores ou superiores podem ser empregados, e diferentes sequências de etapas em vários tempos e temperaturas podem ser conduzidos, como desejado. É desejável, todavia, conduzir a reação de conjugação, pelo menos inicialmente, em temperaturas baixas, preferivelmente de a partir de cerca de 0 °C até cerca de 5 °C, mais preferivelmente em cerca de 4 °C, de modo a reduzir o grau de precipitação do conjugado.

[0086] Com altos rendimentos de conjugação e alta imunogenicidade do produto de conjugação, os processos de conjugação tais como cromatografia em coluna e/ou precipitação por sulfato de amônio do conjugado a partir do polissacarídeo não conjugado podem não ser necessários. Todavia, em certas modalidades, pode ser desejável conduzir uma ou mais etapas de purificação.

#### Os conjugados

[0087] Ambos os reagentes contêm múltiplos grupos reativos por molécula. Uma molécula polissacarídeo ativado pode reagir com e formar mais que uma ligação a mais que uma molécula de proteína ativada. Igualmente, uma molécula de proteína ativada pode reagir com e formar mais que uma ligação a mais que uma molécula de polissacarídeo ativado. Portanto, o produto conjugado é uma mistura de várias estruturas entrelaçadas do tipo matriz reticulada. 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, ou 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 do polissacarídeo, do tipo da proteína, do método de conjugação, das condições de reação, e similar. De modo geral, uma média de 1 ligação até cerca de 2, 3, 4, ou 5 ligações está presente, de modo a evitar interferir com a capacidade da proteína para estimular o imuno-sistema por super-conjugação, e de modo a não induzir mudanças na estrutura do polissacarídeo. Todavia, em certas modalidades, mais que 5 ligações podem ser toleradas ou mesmo desejável.

[0088]Após a conjugação, o conjugado pode ser purificado mediante qualquer método adequado. A purificação é empregada para remover polissacarídeo, proteína, ou subprodutos de reação de molécula pequena não reagidos. Métodos de purificação incluem ultrafiltração, cromatografia de exclusão dimensional, centrifugação por gradiente de densidade, cromatografia por interação hidrofóbica, fracionamento por sulfato de amônio, e similar, como são conhecidos na técnica. Como discutido acima, as reações de conjugação das modalidades preferidas procedem com rendimento superior, e geram menos dos indesejados subprodutos de reação de molécula pequena. Consequentemente, pode não ser necessária purificação, ou apenas um grau muito menor de purificação pode ser desejável. O conjugado pode ser concentrado ou diluído, ou processado como qualquer forma adequada para uso nas composições farmacêuticas, como desejado.

#### Métodos de Tratamento

[0089]Os conjugados preparados de acordo com a modalidade preferida são administrados a um indivíduo em uma dose imunologicamente efetiva em uma forma adequada para tratar e/ou prevenir doenças infecciosas. O termo “indivíduo” como usado aqui, se refere a animais, tais como mamíferos. Por exemplo, mamíferos con-

templados incluem humanos, primatas, cães, gatos, ovelhas, gado de criação, cabritos, porcos, cavalos, ratos, camundongos, coelhos, porcos da Índia, e similares. O termo “indivíduo”, “paciente”, e “hospedeiro” são usados de modo intercambiável. Como usado aqui, uma dose “imunologicamente efetiva” da vacina conjugada é uma dose a qual é adequada para eliciar uma imuno-resposta. A dosagem em particular depende da idade, peso e condição médica do indivíduo a ser tratado, como também do método de administração. Doses adequadas podem ser facilmente determinadas por aqueles usualmente versados na técnica.

[0090] Composições farmacêuticas compreendendo vacinas conjugadas das modalidades preferidas podem oferecer diversas vantagens sobre as vacinas convencionais, incluindo melhorada imunogenicidade de antígenos fracamente imunogênicos, redução potencial na quantidade de antígeno usada, imunizações estimulantes menos frequentes, melhorada eficácia, estimulação preferencial da imunidade, ou objetividade potencial das imuno-respostas. As vacinas podem ser administradas a um indivíduo por meio de uma variedade de rotas, como discutido adiante, incluindo, mas não limitado às rotas de administração parenteral (por ex., por meio de injeção intracisternal e técnicas de infusão), intradérmica, transmembranar, transdérmica (incluindo tópica), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intralesional, subcutânea, oral, e intranasal (por ex., inalação). A vacina conjugada pode ser administrada por meio de injeção de bolus ou mediante infusão contínua, bem como por meio de administração localizada, por ex, em um sítio da doença ou do dano. A vacina conjugada pode ser opcionalmente administrada em um veículo farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitável.

[0091] O termo “vacina” como usado aqui, é um termo amplo e é empregado em seu sentido usual, que inclui, sem limitação, conjugados das modalidades preferidas ou outros antígenos formulados com adjuvantes, diluentes, excipientes, veículos, e outras substâncias farmacêuticamente aceitáveis. O termo “farmacêuticamente

aceitável” é usado para referir a um material não tóxico que é compatível com um sistema biológico tal como uma célula, cultura de células, tecido, ou organismo.

[0092] Os protocolos de imunização para uso com os conjugados das modalidades preferidas proporcionam composições e métodos para prevenir ou tratar uma doença, distúrbio e/ou infecção em um indivíduo. O termo “tratar” como usado aqui, é um termo amplo e é empregado em seu sentido usual, incluindo, sem limitação, curativo, preventivo, profilático, paliativo e/ou tratamento melhorativo.

[0093] As composições de vacina são preferivelmente estéreis e contêm um ou outro de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz do conjugado em uma unidade de peso ou volume adequada para administração a um indivíduo. O termo “veículo farmacêuticamente aceitável” como usado aqui significa uma ou mais cargas, diluentes ou substâncias encapsulantes sólidas ou líquidas compatíveis as quais são adequadas para a administração a 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 rota de administração. Veículos fisiologicamente e farmacêuticamente aceitáveis incluem diluentes, cargas, sais, tampões, estabilizantes, solubilizantes, e outros materiais os quais são bem conhecidos na técnica.

[0094] Os componentes das composições farmacêuticas também são capazes de serem misturados com os conjugados da modalidade preferida, e com cada um outro, em um modo que não haja interação que prejudique substancialmente a eficácia farmacêutica desejada.

[0095] A formulação das vacinas conjugadas das modalidades preferidas na forma de composições farmacêuticas pode ser conseguida usando métodos conhecidos na técnica. As composições de vacina podem também conter um ou mais adjuvantes. Adjuvantes adequados incluem, por exemplo, adjuvantes alumínio, tais como hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, Adjuvante de Freund, BAY, DC-

chol, pcpp, monofosforil lipídio A, CpG, QS-21, toxina da cólera e peptida formil metionila. Ver, por ex., Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, 1995 (M. F. Powell and M. J. Newman, eds., Plenum Press, N. Y.).

[0096]A dosagem da vacina conjugada a ser administrada a um indivíduo e o regime de administração pode ser determinada de acordo com técnicas padrões bem conhecidas por aqueles versados nas técnicas farmacêutica e veterinária, levando em conta fatores tais como o uso pretendido, o antígeno em particular, o adjuvante (se presente), a idade, sexo, peso, espécies, condição geral, doença e/ou tratamentos anteriores, e a rota de administração. Doses preliminares podem ser determinadas de acordo com os testes em animais, e a escala das dosagens para administração humana é realizada de acordo com as práticas aceitas na técnica tais como ensaios padrões de dosagem. Por exemplo, a dose terapeuticamente eficaz pode ser avaliada inicialmente a partir da realização de teste do nível de anticorpo no soro. A dosagem depende da atividade específica do conjugado e pode ser facilmente determinada mediante experimentação de rotina.

[0097]Na prática de protocolos de imunização para tratamento e/ou prevenção de doenças específicas, uma quantidade terapeuticamente eficaz de conjugado é administrada a um indivíduo. Como usado aqui, o termo “quantidade eficaz” significa a quantidade total do agente terapêutico (por ex., conjugado) ou de outro componente ativo que é suficiente para apresentar um benefício significativo ao indivíduo, tal como, melhorada imuno-resposta, tratamento, cura, prevenção ou melhora da condição médica pertinente (doença, infecção, ou similar), ou um aumento na taxa do tratamento, cura, prevenção ou melhoria de tais condições. Quando a “quantidade eficaz” é aplicada a um agente terapêutico individual administrado sozinho, o termo se refere àquele agente terapêutico sozinho. Quando aplicado a uma combinação, o termo se refere às quantidades combinadas dos ingredientes que resultam no efeito terapêutico, seja administrado em combinação, serialmente ou simultanea-

mente. Como usado aqui, a frase “administrar uma 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 tempo suficiente para induzir uma melhora, e preferivelmente uma melhora sustentada, em pelo menos um indicador que reflete a gravidade da doença, infecção, ou distúrbio.

[0098]Uma melhora é considerada “sustentada” se o paciente apresenta a melhora em pelo menos duas ocasiões separadas por um período de tempo. O grau de melhora pode ser determinado baseado em, por exemplo, dados imunológicos, ou em sinais ou sintomas de uma doença, infecção, ou distúrbio. Vários indicadores que refletem a extensão da enfermidade do paciente podem ser avaliados para a determinação de se a quantidade e o tempo do tratamento é suficiente. O valor de referência para o indicador ou indicadores escolhidos pode ser estabelecido baseado por exame do paciente antes da administração da primeira dose do agente terapêutico, ou baseado em valores estatísticos gerados a partir de uma população de pacientes saudáveis. Se o agente terapêutico é administrado para tratar sintomas agudos, a primeira dose é administrada praticamente o mais breve possível. A melhora é induzida mediante administrar agentes terapêuticos até que o indivíduo manifeste uma melhora sobre o valor de referência para o indicador ou indicadores escolhidos. No tratamento de condições crônicas, esse grau de melhora é obtido mediante administrar de modo repetido os agentes terapêuticos durante um período de tempo, por ex., por um, dois, ou três meses ou mais, ou indefinidamente. Uma única dose pode ser suficiente para tratar ou prevenir certas condições. O tratamento pode ser continuado indefinidamente ao mesmo nível ou em dose ou frequência reduzida, a despeito da condição do paciente, se desejado. Uma vez o tratamento tenha sido reduzido ou descontinuado, ele ao final pode ser reassumido ao nível original se os sintomas reaparecerem.

[0099]De modo geral, a quantidade de conjugado que proporciona uma dose

eficaz ou terapeuticamente eficaz para vacinação contra infecção bacteriana é de a partir de cerca de 1 µg ou menos até cerca de 100 µg ou mais, preferivelmente de a partir de cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 µg até cerca de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, ou 95 µg por kg de peso corporal. Uma dosagem eficaz pode requerer menos anticorpo se o tempo de pós-infecção decorrido é menor, uma vez que existe menos tempo para a bactéria se proliferar. Uma dosagem eficaz pode também depender da carga bacteriana no momento do diagnóstico. Múltiplas injeções administradas durante um período de dias pode ser considerada para utilização terapêutica.

[00100]As vacinas conjugadas podem ser administradas como uma dose única ou em uma série incluindo um ou mais reforçadores. Por exemplo, um bebê ou criança pode receber uma única dose precocemente na vida, em seguida ser administrada uma dose de reforço até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais anos depois. A dose de reforço gera anticorpos provenientes das pilhas de células-B, isto é, uma resposta anamnésica. Isto é, a vacina conjugada elicia uma alta resposta anticorpo funcional primária em bebês ou crianças, e é capaz de eliciar uma resposta anamnésica seguida por administração de um reforço, demonstrando que a imunoresposta protetora eliciada pela vacina conjugada é de longo prazo.

[00101]As vacinas conjugadas podem ser formuladas dentro de preparações líquidas para, por ex., administração oral, nasal, anal, retal, bucal, vaginal, peroral, intragástrica, mucosal, perlingual, alveolar, gengival, olfativa, ou pela mucosa respiratória. Formas adequadas para tal administração incluem suspensões, xaropes, e elixires. As vacinas conjugadas podem ser também formuladas para administração parenteral, subcutânea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, ou intravenosa, administração injetável, de liberação controlada a partir de implantes, ou administração por meio de gotas oculares. Formas adequadas para tal administração incluem suspensões e emulsões estéreis. Tais vacinas conjugadas podem estar em mistura

com um adequado veículo, diluente, ou excipiente tal como água estéril, solução salina fisiológica, glicose, e similar. As vacinas conjugadas podem ser também liofilizadas. As vacinas conjugadas podem conter substâncias auxiliares tais como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes tamponadores de pH, aditivos formadores de gel ou estimuladores da viscosidade, conservantes, agentes aromatizantes, corantes, e similares, dependendo da rota de administração e da preparação desejada. Textos padrões, tais como “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, Lippincott Williams & Wilkins; 20th edition (June 1, 2003) e “Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Pub. Co.; 18th and 19th editions (dezembro de 1985, e junho de 1990, respectivamente), incorporados aqui por referência em suas totalidades, podem ser consultados para preparar preparações adequadas, sem experimentação indevida. Tais preparações podem incluir agentes complexantes, íons metálicos, compostos poliméricos tais como ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogéis, dextrano, e similar, lipossomas, microemulsões, micelas, vesículas unilamelares ou multilamelares, “ghosts” de eritrócitos ou esferoblastos. Lipídios adequados para formulação lipossomal incluem, sem limitação, monoglicerídeos, diglicerídeos, sulfatídeos, lisolecitina, fosfolipídeos, saponina, ácidos da bile, e similar. A presença de tais componentes adicionais pode influenciar o estado físico, solubilidade, estabilidade, taxa de liberação in vivo, e taxa de tolerância in vivo, e são desse modo escolhidos de acordo com a aplicação pretendida, tal que as características do veículo são modeladas para a rota de administração selecionada.

[00102]As vacinas conjugadas são preferivelmente providas como suspensões líquidas ou produtos secados por congelamento. Preparações líquidas adequadas incluem, por ex., solução aquosas isotônicas, suspensões, emulsões, ou composições viscosas que são tamponadas a um pH selecionado. Preparações transdérmicas incluem loções, géis, borrifos, pomadas ou outras técnicas adequadas. Se é desejada administração nasal ou respiratória (mucosal) (por ex., inalação

ou insuflação por aerossol), as composições podem estar em uma forma e dispensadas por meio de um dispensador de apertar, dispensador de bomba ou dispensador aerossol. Os aerossóis estão usualmente sob pressão por meio de um hidrocarboneto. Os dispensadores por bomba podem preferivelmente dispensar uma dose medida ou uma dose possuindo um tamanho de partícula em particular, como discutido adiante.

[00103]Quando na forma de soluções, suspensões e géis, as formulações do conjugado podem tipicamente conter uma quantidade principal de água (preferivelmente água purificada) em adição ao ingrediente ativo. Quantidades menores de outros ingredientes tais como ajustadores de pH, emulsificantes, agentes dispersantes, agentes de tamponamento, conservantes, agentes umectantes, agentes formadores de gel, corantes, e similares podem estar também presentes.

[00104]As composições são preferivelmente isotônicas com o sangue ou outro fluido corporal do receptor. A isotonicidade das composições pode ser conseguida usando tartarato de sódio, propileno glicol ou outros solutos orgânicos ou inorgânicos. Cloreto de sódio é particularmente preferido. Agentes de tamponamento podem ser empregados, tais como ácido acético e sais, ácido cítrico e sais, ácido bórico e sais, e ácido fosfórico e sais. Veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, lactados de Ringer ou óleos fixados. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e de nutrientes, reabastecedores de eletrólito (tais como aqueles com base em dextrose de Ringer), e similar.

[00105]A viscosidade das composições pode ser mantida no nível selecionado usando um agente espessante farmacologicamente aceitável. Metilcelulose é preferido porque ela é facilmente disponível e econômica e é fácil de se lidar. Outros agentes espessantes adequados incluem, por exemplo, goma xantana, carboximetilcelulose, hidroxipropilcelulose, carbômero, e similar. A concentração preferida do

espessante pode depender do agente selecionado. O ponto importante é utilizar uma quantidade que possa conseguir a viscosidade selecionada. Composições viscosas são normalmente preparadas a partir de soluções mediante a adição de tais agentes espessantes.

[00106]Um conservante farmacêuticamente aceitável pode ser empregado para aumentar o prazo de validade das composições. Álcool benzílico pode ser adequado, embora uma variedade de conservantes incluindo, por exemplo, parabenos, timerosal, clorobutanol, ou cloreto de benzalcônio possam ser também empregados. Uma concentração adequada de conservante pode ser de a partir de 0,02% a 2% com base no peso total, embora possa haver apreciável variação dependendo do agente selecionado.

[00107]A transferência pulmonar do conjugado pode ser também empregada. O conjugado é transferido aos pulmões de um mamífero durante inalação e atravessa ao longo da parte interna epitelial do pulmão para corrente sanguínea. Uma ampla variedade de dispositivos mecânicos projetados para transferência pulmonar de produtos terapêuticos pode ser empregada, incluindo, mas não limitado a, nebulizadores, inaladores de dose medida, e inaladores de pó, todos os quais são familiares para aqueles versados na técnica. Esses dispositivos empregam formulações adequadas para a dispensação do conjugado. Tipicamente, cada formulação é específica ao tipo de dispositivo empregado e pode envolver o uso de um material propelente apropriado, em adição a diluentes, adjuvantes e/ou veículos úteis na terapia.

[00108]O conjugado é proveitosamente preparado para transferência pulmonar em forma particulada com um tamanho médio de partícula de a partir de 0,1  $\mu\text{m}$  ou menos até 10  $\mu\text{m}$  ou mais, mais preferivelmente de a partir de cerca de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, ou 0,9  $\mu\text{m}$  até 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  $\mu\text{m}$  para a transferência pulmonar. Veículos farmacêuticamente aceitáveis para transferência pulmonar dos conjugados inclu-

em carboidratos tais como trealose, manitol, xilitol, sacarose, lactose, e sorbitol. Outros ingredientes para uso nas formulações podem incluir DPPC, DOPE, DSPC e DOPC. Tensoativos naturais ou sintéticos podem ser usados, incluindo polietileno glicol e dextranos, tais como ciclodextrano. Sais de bile e outros realçadores, bem como celulose e derivados de celulose, e aminoácidos podem ser também utilizados. Lipossomas, microcápsulas, microesferas, complexos de inclusão, e outros tipos de veículos podem ser também empregados.

[00109]Formulações adequadas para uso com um nebulizador, seja por jato ou ultrassônico, compreendem tipicamente o conjugado dissolvido ou suspenso em água a uma concentração de cerca de 0,01 ou menos até 100 mg ou mais de conjugado por mL de solução, preferivelmente de a partir de cerca de 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 mg até 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 pode também incluir um tampão e um açúcar simples (por ex., para a estabilização da proteína e a regulação da pressão osmótica). A formulação do nebulizador pode também conter um tensoativo, para reduzir ou prevenir a agregação induzida na superfície do conjugado provocada pela atomização da solução na formação do aerossol.

[00110]Formulações para uso com um dispositivo inalador de dose medida compreende geralmente um pó finamente dividido contendo o composto inventivo suspenso em um propelente com a ajuda de um tensoativo. O propelente pode incluir propelentes convencionais, tais como clorofluorcarbono, hidroclorofluorcarbonos, e hidrocarbonetos, tais como triclorofluormetano, diclorodifluormetano, diclorotetrafluoretanol, e 1,1,2,2-tetrafluoretano, e suas combinações. Tensoativos adequados incluem trioleato de sorbitano, lecitina de soja, e ácido oléico.

[00111]Formulações para dispensação a partir de um dispositivo inalador de pó compreendem tipicamente um pó seco finamente dividido contendo o conjugado, incluindo opcionalmente um agente mássico, tal como lactose, sorbitol, sacarose,

manitol, trealose, ou xilitol em uma quantidade que facilite a dispersão do pó a partir do dispositivo, tipicamente de a partir de cerca de 1% em peso ou menos até 99% em peso ou mais da formulação, preferivelmente de a partir de cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50% em peso até cerca de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, ou 90% em peso da formulação.

[00112]Quando o conjugado é administrado por meio intravenoso, cutâneo, subcutâneo, ou outra injeção, a vacina conjugada está preferivelmente na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável, livre de pirogênios. A preparação de soluções parenteralmente aceitáveis com adequados pH, isotonicidade, estabilidade, e similar, está dentro da experiência da técnica. Uma composição farmacêutica preferida para injeção preferivelmente contém um veículo isotônico tal como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Dextrose, Injeção de Cloreto de Sódio e Dextrose, Injeção de Ringer Lactado, ou outros veículos como são conhecidos na técnica. As composições farmacêuticas podem também conter estabilizantes, conservantes, tampões, antioxidantes, ou outros aditivos conhecidos por aqueles versados na técnica.

[00113]A duração da injeção pode variar dependendo de diversos fatores, e pode compreender uma única injeção administrada durante o transcurso de uns 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.

[00114]O conjugado pode ser administrado de modo tópico, sistemático ou local, por meio de um líquido ou gel, ou como um implante ou dispositivo.

[00115]Os conjugados das modalidades preferidas, ou os métodos de conjugação das modalidades preferidas, podem ser úteis na preparação de vacinas para o tratamento de uma variedade de infecções bacterianas, incluindo infecções por *Helicobacter pyloris*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophilia*, *Mycobacteria sps.*

(por ex., *M. tuberculosis*, *M. avium*, *lid. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* Group A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* Group B), *Streptococcus (viridans group)*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus (anaerobic sps.)*, *Streptococcus pneumoniae*, *pathogenic Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringers*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, e *Actinomyces israeli*.

[00116] Certos métodos das modalidade preferidas podem ser também de uso na preparação de vacinas para o tratamento ou vacinação de indivíduos contra câncer, tais como de mamíferos, sarcomas e carcinomas, tais como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinoviomoma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de cólon, câncer pancreático, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, carcinoma de glândulas sudoríparas, carcinoma de glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma do duto da bile, coriocarcinoma, serminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmão, carcinoma pulmonar de célula pequena, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias,

tais como leucemia linfocítica aguda e leucemia mielocítica aguda (leucemia mielo-blástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritroleucemia); leucemia crônica (leucemia mielocítica crônica (granulocítica) e leucemia linfocítica crônica); e policitemia verdadeira, linfoma (doença de Hodgkin e doença de não-Hodgkin), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, e doença da cadeia pesada, distúrbios linfoproliferativos incluindo síndrome linfoproliferativa auto-imune (ALPS), leucemia linfoblástica crônica, leucemia de células capilares, leucemia linfática crônica, linfoma de célula-T periférica, linfoma de linfócito pequeno, linfoma de célula do manto, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de célula-T vírus-positivo Epstein Barr, linfoma histocítico, doença de Hodgkin, linfoma agressivo difuso, leucemias linfáticas agudas, doença linfoproliferativa T gamma, linfoma de célula-B cutânea, linfoma de célula-T cutânea (isto é, micoses fungóides) e síndrome de Szari.

[00117]Os conjugados podem ser administrados em combinação com várias vacinas ou que estejam atualmente sendo utilizadas ou que estejam em desenvolvimento, caso seja pretendida para indivíduos humanos ou não humanos. Exemplos de vacinas para indivíduos humanos e direcionadas para doenças infecciosas incluem a vacina combinada de difteria e toxóides do tétano; vacina de célula integral da coqueluche; vacina da gripe inativada; vacina pneumocócica 23-valente; vacina do sarampo vivo; vacina da caxumba viva; vacina da rubéola viva; vacina da tuberculose Bacille Calmette-Guerin (BCG); vacina da hepatite A; vacina da hepatite B; vacina da hepatite C; vacina da raiva (por ex., vacina da célula diplóide humana); vacina da pólio inativada; vacina do polissacarídeo meningocócico; vacina meningocócica quadrivalente; vacina do vírus da febre amarela vivo; vacina da célula tifóide integral morta; vacina do cólera; vacina do vírus da encefalite B japonesa morto; vacina do adenovírus; vacina do citometalovírus; vacina do rotavírus; vacina da varicela; vacina do antrax; vacina da varíola; e outras vacinas comercialmente disponíveis e experimentais.

[00118]Os conjugados podem ser providos a um médico administrador ou outro profissional de cuidados de saúde na forma de um kit. O kit é uma embalagem que acomoda um recipiente que contém uma vacina conjugada e instruções para a administração da vacina conjugada a um indivíduo. O kit pode opcionalmente conter uma ou mais ferramentas diagnósticas e instruções para uso. Por exemplo, um coquetel de vacinas contendo duas ou mais vacinas pode estar incluído, ou composições farmacêuticas separadas contendo diferentes vacinas ou agentes terapêuticos. O kit pode também conter doses separadas da vacina conjugada para administração em série ou sequenciada. O kit pode conter dispositivos adequados de transferência, por ex., seringas, dispositivos de inalação, e similar, juntamente com instruções para a administração dos agentes terapêuticos. O kit pode opcionalmente conter instruções para armazenamento, reconstituição (se aplicável), e a administração de qualquer um ou de todos os agentes terapêuticos incluídos. Os kits podem incluir uma pluralidade de recipiente refletindo o número de administrações a serem dadas a um indivíduo. Se o kit contiver um primeiro e segundo recipientes, então uma pluralidade desses pode estar presente.

### Experimentos

#### Materiais

[00119]O toxóide do tétano (TT) foi obtido da Lederle Vaccines, Pearl River, NY and Serum Institute of India, Pune, Índia. Os polissacarídeos meningocócicos dos grupos A e C (PS Mn A e PS Mn C, respectivamente) foram obtidos da Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. PS Mn A foram também obtidos da SynCo Bio Partners, Amsterdam, Holanda. PSs Mn W135 e Y foram obtidos da Aventis Pasteur. PSs de *Pneumococcus* (Pn) sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F and 33F foram obtidos da Lederle Vaccines. PS de *Hemophilus influenzae* tipo b (PRP ou Hib PS) foi obtido da Lederle Vaccines. PS Vi da *Salmonella typhi* foi obtido da Aventis Pasteur. Os PSs do strepto-

coccus grupo B sorotipos III e V foram isolados a partir do meio de cultura de acordo com o protocolo publicado. Ver Carey e outros, *Infection and Immunity* 1980; 28: 195-203. Hidrazina, carboidrazida, diidrazida do ácido adípico (ADH), cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC), N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfônico) (HEPES), periodato de sódio, boroidrato de sódio, cinoboroidrato de sódio, tetrafluorborato de 4-cino-dimetilamino-piridínio (CDAP) e 1-amino-2,3-propanodiol foram adquiridos da Sigma/Aldrich Chemical Company. Kit de ensaio TNBSA (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico) e BCA (ácido bicinconínico) foram adquiridos da Pierce.

### Métodos

[00120]Os polissacarídeos bacterianos usados para a conjugação à proteína por meio dos métodos descritos aqui incluem polissacarídeos Meningocócicos dos sorogrupos A, C, W135 e Y, polissacarídeos Pneumocócicos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, polissacarídeo *Hemophilus influenza* tipo b (PRP ou Hib PS), polissacarídeo Vi da *Salmonella typhi* e polissacarídeos do Streptococcus grupo B sorotipos III e V. Três métodos gerais são descritos para a conjugação dos polissacarídeos à proteína, referido adiante como Método Geral A, Método Geral B, e Método Geral C.

#### Método Geral A: PS aldeído-ativado à proteína hidrazida-ativada (conjugação por aminação redutora)

[00121]O toxóide do tétano é ativado com hidrazina ou diidrazida do ácido adípico em presença de EDC a pH 6,5 e em seguida trocados em tamponamento com NaCl 30 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 mM, pH de cerca de 10,5. O polissacarídeo é ativado com NaIO<sub>4</sub>, e trocado em tamponamento com HEPES 10 mM, pH 7,5, 4 °C. TT hidrazida-ativado é reagido com polissacarídeo aldeído-ativado em relações de a partir de 2:1 a 1:2 e faixa de variação de concentração de 1-40 mg/mL de um dia para o outro, pH 6,5-7,5, 4-40 °C. NaBH<sub>4</sub> (dez vezes mols de grupos aldeído no reagente

inicial) é em seguida reagido por 6 horas para reduzir a dupla ligação C=N para ligação simples C-N e também reduzir os grupos aldeído não reagidos a álcool. A solução é trocada em tamponamento com solução salina, HEPES 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM usando uma membrana de corte de peso molecular 12-14 kDa. O teor de proteína total é determinado pelo ensaio de Lowry (ver Pierce Catálogo 2003-2004, página 306). O teor de polissacarídeo total é determinado mediante vários ensaios químicos para diferentes polissacarídeos bacterianos, por ex., ensaio resorcinol para PSs Mn A e C (Monsigny e outros, Anal. Biochem. 1988; 175: 525-530), ensaio antrona para PSs Pn (Keleti e outros, Handbook of micromethods for the biological sciences. 61. Hexoses (Anthrone). Página 73. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1974), ensaio fósforo para PS Mn A, PS Hib e PS Pn contendo fósforo, e ensaio purpald para PSs Mn W135 e Y e PSs Pn contendo glicol (Lee e outros, Anal. Biochem. 2001; 296: 73-82).

Método Geral B: PS cianato-ativado à proteína hidrazida-ativada (conjugação por cianilação)

[00122]O toxóide do tétano é ativado com hidrazina ou diidrazida do ácido adípico em presença de EDC a pH 6,5 e em seguida trocado em tamponamento com NaCl 30 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 mM, pH em torno de 10,5. O polissacarídeo é ativado com CDAP por 2-2,5 minutos a 20-24 °C em presença de trietilamina. A 4 °C, o TT hidrazida-ativado é reagido com polissacarídeo cianato-ativado em relações de a partir de 2:1 a 1:2 e faixa de variação de concentração de 0,2-1 mg/mL, pH 6,5-7,5. Após a reação por 36 horas a 4 °C, a mistura é incubada a 20-24 °C por outras 18 horas. A incubação prolongada é para assegurar a decomposição dos grupos cianatos residuais remanescentes não reagidos. A solução é trocada em tamponamento com solução salina, HEPES 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM usando uma membrana de corte de peso molecular 12-14 kDa. O teor de proteína total é determinado pelo ensaio de Lowry como indicado acima em referência ao Método Geral A. O teor de polissacarí-

deo total é determinado mediante vários ensaios químicos para diferentes polissacarídeos bacterianos, por ex., ensaio resorcinol para PSs Mn A e C, ensaio antrona para PSs Pn, ensaio fósforo para PS Mn A, PS Hib e PS Pn contendo fósforo, e ensaio purpald para PSs Mn W135 e Y e PSs Pn contendo glicol, como indicado acima em referência ao Método Geral A.

Método Geral C: PS hidrazida-ativado à proteína aldeído-ativada (conjugação por aminação redutora)

[00123]O toxóide do tétano é reagido com 1-amino-2,3-propanodiol (APDO) em presença de EDC a pH 6,5 e em seguida trocada em tamponamento com NaCl 30 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 mM, pH em torno de 10,5. O TT-APDO é reagido com NaIO<sub>4</sub> para criar grupos aldeído e em seguida trocado em tamponamento com NaCl 30 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 mM, pH em torno de 10,5. Três métodos são usados para preparar polissacarídeo hidrazida-ativado: a) PS é reagido com NaIO<sub>4</sub> e em seguida diidrazida de ácido adípico com subsequente redução com NaBH<sub>4</sub> (aminação redutora); b) PS é ativado com CDAP e em seguida reage com diidrazida do ácido adípico (reação de conjugação por cianilação); ou c) PS é reagido com diidrazida do ácido adípico na presença de EDC (reação carbodiimida). TT aldeído-ativado é reagido com PS hidrazida-ativado a uma relação de a partir de 2:1 a 1:2 e faixa de variação de concentração de 1-5 mg/mL por 18 horas, pH 6,5-7,5, 4-40 °C. NaBH<sub>4</sub> (dez vezes mols de aldeído no reagente inicial) é em seguida acrescentado por 6 horas para reduzir a dupla ligação C=N para ligação simples C-N e também reduzir os grupos aldeído não reagidos a álcool. A solução é trocada em tamponamento com solução salina, HEPES 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM usando uma membrana de corte com peso molecular 12-14 KDa. O teor de proteína total é determinado pelo ensaio de Lowry, como indicado na referência ao Método geral A. O teor de polissacarídeo total é determinado através de vários ensaios químicos para diferentes polissacarídeos bacterianos, por ex., ensaio resorcinol para PSs Mn A e C, ensaio antrona para PSs Pn, en-

saio fósforo para PS Mn A, PS Hib e PS Pn contendo fósforo, e ensaio purpald para PSs Mn W135 e Y e PSs Pn contendo glicol, como indicado acima em referência ao Método Geral A.

#### Ensaio Físico-químico dos reagentes, PS ativado e produtos conjugados

#### Cromatografia líquida de exclusão dimensional de alta performance (HPSEC)

[00124] Amostras de proteínas, polissacarídeos e produtos conjugados (25 µL, 0,01-1 mg/mL) foram corridas através de uma coluna Waters Ultrahydrogel 2000 ou Ultrahydrogel Linear com solução salina a 0,5 mL/minuto em um sistema HPLC Dionex usando software Chromeleon, um detector UV a 280 nm e 206 nm e um refratômetro diferencial Waters 2410 (detector IV). O detector UV a 280 nm monitorou os sinais das espécies contendo proteína bem como compostos contendo frações aromáticas. O detector UV 206 nm detectou a proteína e o PS mediante a presença de grupos carbonila, enquanto que o detector IV mediu os sinais de proteínas, polissacarídeos, conjugados e sais.

#### Imunogenicidade de conjugados polissacarídeo-proteína em ratos

#### Imunização de ratos

[00125] Ratos (NIH-Suíços; grupos de 10) foram imunizados com 1 µg/dose de polissacarídeo ou conjugado de polissacarídeo-proteína preparado pelo Método Geral A (conjugados PS-TT Mn A e PS-TT Mn C), B (conjugados PS-TT Pn 6B e PS-TT Pn 7F) e o Método Geral C (conjugado PS-TT Pn 9V) nos dias 0 e 14, ou nos dias 0, 14 e 28, com anti-soro coletado no dia 28 e 42, respectivamente. ELISA foi realizado para a determinação dos níveis de anticorpo contra os respectivos polissacarídeos nativos.

#### Método ELISA

[00126] Placas Immunolon 1 (Dynatech) foram revestidas com 100 µL de solução de revestimento contendo polissacarídeo (5 µg/mL PSs Mn A e C, e Pn 7F; 2

µg/mL para PS Pn 6B; e 2,5 µg/mL para PS Pn 9V) misturada com albumina de soro humano metilado (5 µg/mL para PSs Mn A e C e 7F; e 2,5 µg/mL para PS Pn 9V) por 18 horas. Após lavagem três vezes com 150 µL de tampão de lavagem (PBS com 0,05% Tween 20, 0,02% NaN<sub>3</sub>), 100 µL de amostras anti-soro específicas e soro de referência (com assinadas 3200 unidades/mL de anticorpo anti-polissacarídeo; duplicata) em uma diluição serial de duas vezes partindo de 1/200 (diluída com tampão de diluição contendo PBS, 4% de soro de novilho recém nascido, 0,02% NaN<sub>3</sub> (com 2 µg/mL polissacarídeo da parede celular em casos pneumocócicos)), foi acrescentado para cada cavidade. Após a incubação de um dia para o outro, as placas foram lavadas três vezes e incubadas com 100 µL de conjugado de cabra anti-rato IgG Fc com fosfato alcalino (diluição 1/3000 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 1M Tris, pH 9,8, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>) por 30 minutos e a reação foi interrompida por 50 µL NaOH 1N. As leituras ELISA foram medidas com um leitor de placa e os níveis de anticorpo anti-polissacarídeo das amostras do anti-soro foram calculados a partir das leituras ELISA e da curva padrão do soro de referência co-ensaiado na mesma placa. A média geométrica do nível de anticorpo para cada grupo de ratos foi calculada.

#### Exemplos Específicos

##### Método A - Conjugado Meningococcus Grupo C

##### Ativação de TT para conter grupos hidrazida

[00127]Toxóide do tétano (4,2 mg/mL) foi ativado com 0,42 M hidrazina ou diidrazida do ácido adípico em presença de 20 mM EDC, 0,1 M MES, pH 6,5 a 20-24 °C. Após reagir por 4 horas, o pH da mistura reacional foi elevado para 7,5-10 com NaOH 1N para interromper a reação. A mistura reacional foi trocada em tamponamento com 30 mM NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 mM, pH em torno de 10,5 a 4 °C usando uma membrana de diálise 12-14 KDa. A concentração de proteína da amostra de TT-

hidrazida resultante foi determinada pelo ensaio de Lowry (ver Pierce Catalog 2003-2004, pág. 306) usando albumina de soro bovino como um padrão. O teor de hidrazida foi determinado pelo ensaio TNBS usando diidrazida do ácido adípico como um padrão, como descrito em Vidal, J. Immunol. Methods 1986; 86: 155-156. O grau de ativação do TT assim preparado foi de aproximadamente 50 grupos hidrazida por molécula TT.

#### Ativação de PS MnC para conter grupos aldeído

[00128]PS Mn C (10 mg/mL) foi reagido com  $\text{NaIO}_4$  6 mM a 20-24 °C por 4 horas. A amostra foi dialisada contra 10 mM HEPES, pH 7,5 a 4 °C usando membrana de diálise 12-14 KDa. A concentração do PS ativado resultante foi determinada mediante ensaio rosorcinol usando ácido N-acetil neuramínico como o padrão com um fator de correção de PS Mn C/ácido N-acetil neuramínico = 1.104/L, como descrito em Monsigny e outros, Anal. Biochem. 1988; 175: 525-530. O teor de aldeído do PS ativado foi determinado por ensaio BCA (Pierce Catalog 2003-2004, páginas 241 e 305) usando glicose como um padrão. O grau de ativação da PS Mn C ativado preparado por esse protocolo foi de aproximadamente um grupo aldeído por 80 monômeros.

#### Conjugação de PS Mn C ativado para TT ativado

[00129]Uma alíquota de TT contendo hidrazida foi ajustada para 25 mg/mL por liofilização e dissolução em água. Uma alíquota de PS Mn C contendo aldeído foi ajustada para 25 mg/mL por liofilização e dissolução em 0,2 M HEPES, pH 7,5, 30 mM EDTA. A solução de TT ativado foi acrescentada a um volume igual de PS Mn C ativada e turbilhonada. A mistura reacional foi incubada a 20-24 °C por 18 horas. A mistura reacional foi tratada com  $\text{NaBH}_4$  (10 vezes equivalente molar para a concentração inicial de aldeído no PS ativado) por 6 horas. A solução foi trocada em tamponamento com solução salina, 10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA usando uma membrana de corte de peso molecular 12-14 KDa. A proteína total foi determi-

nada pelo ensaio de Lowry usando albumina de soro bovino como um padrão. O teor de PS Mn C total foi determinado pelo ensaio resorcinol usando ácido N-acetilneuramínico como um padrão, como descrito em Monsigny e outros, Anal. Biochem. 1988; 175: 525-530.

[00130]Quatro conjugados PS-TT Mn C foram preparados usando hidrazina ou diidrazida do ácido adípico como um espaçador. A Figura 3 mostra os perfis de eluição HPSEC (monitorados a 280 nm) desses conjugados. Um ligeiro deslocamento entre os perfis e um ombro direito a 22,5-25 minutos da proteína livre não conjugada foi observado.

[00131]O PS Mn C não conjugado foi determinado pelo método de absorção de partícula C18 de proteína em produto conjugado seguido pela comparação do sinal sacarídeo do sobrenadante em HPSEC àquele do PS Mn C ativado de concentrações conhecidas (Figuras 4 e 5). Para avaliar o rendimento da reação de conjugação, o produto conjugado foi diluído para aproximadamente 1 mg/mL de concentração de PS Mn C. 100 µL dessa solução foi misturada e incubada com 250 µL das partículas C18 ativadas por uma hora com agitação suave. O sobrenadante foi coletado após centrifugação, e o gel C18 foi lavado duas vezes com 100 µL de solução salina. O sobrenadante combinado e lavado foi ajustado para 333 µL com solução salina e passado através de um microfiltro de membrana de 0,2 µm. O filtrado foi analisado com HPSEC juntamente com as concentrações padrões de PS Mn C ativado a 0,033, 0,067 e 0,134 mg/mL, produzindo a área dos sinais de sacarídeo dessas amostras como 19,4, 4,8, 9,2 e 18,4, respectivamente. A concentração de sacarídeo do filtrado foi calculada a partir da curva padrão como 0,141 mg/mL, o que foi 3,3 vezes o volume da amostra inicial. Assim, a amostra de partida continha 0,465 mg/mL (0,141 mg/mL x 3,3) de PS Mn C livre. A concentração total de PS Mn C foi determinada como 1,131 mg/mL pelo ensaio resorcinol modificado. O rendimento foi avaliado ser em torno de 60% ( $100\% \times (1 - 0,465/1,131)$ ).

### Imunogenicidade de conjugados PS-TT Mn C

[00132] Os conjugados preparados como descritos acima foram usados para imunizar grupos de 10 ratos com polissacarídeo nativo como um controle a 1 µg polissacarídeo/dose nos dias 0 e 14. As médias geométricas dos níveis de anticorpo induzidos (unidades/mL) duas semanas pós 2ª injeção foram 16 (8, 34; intervalo de confiança SD) para o grupo de controle e 2141 (1069, 4285), 4228 (2189, 8167), 1092 (655, 1820) e 3977 (2423, 6526) para as quatro bateladas de conjugados produzidas pelo Método A, considerando 3200 unidades/mL para o soro de referência (Tabela 4). Os conjugados induziram 68-264 vezes mais anticorpo anti-PS Mn C específico em ratos como comparado ao controle PS Mn C nativo.

Tabela 4

| Grupos de ratos de diferentes conjugados e polissacarídeos imunogênicos | Espaçador usado no conjugado | Média geométrica de nível de anticorpo anti-MCPS, unidades/mL (CI) <sup>a</sup> | Veze de aumento sobre o grupo de controle |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| PS Mn C nativo (controle)                                               | --                           | 16 (8, 34)                                                                      | --                                        |
| Conjugado MC6xTTH                                                       | Hidrazina                    | 2141 (1096, 4285)                                                               | 134                                       |
| Conjugado Mix TTHb                                                      | Hidrazibna                   | 4228 (2189, 8167)                                                               | 264                                       |
| Conjugado MC6xTTADH                                                     | ADH                          | 1092 (655, 1820)                                                                | 68                                        |
| Conjugado Mix bTTADH                                                    | ADH                          | 3977 (2423, 6526)                                                               | 248                                       |

<sup>a</sup>A média geométrica dos níveis de anticorpo anti-PS Mn C (comparado a um soro de referência com nível de anticorpo anti-PS Mn C de 3200 unidades/mL) com 1 intervalo de confiança SD de grupos de ratos (10 ratos por grupo) duas semanas pós 2ª imunização com 1 µg/dose PS Mn C nativa ou cada um dos quatro conjuga-

dos PS-TT Mn C.

#### Método A - Conjugado Meningococcus grupo A

##### Ativação de TT para conter grupos hidrazida

[00133]Toxóide do tétano (4,2 mg/mL) é ativado com 0,42 M hidrazina na presença de 20 mM EDC, 0,1 M MES, pH 6,5 a 20-24 °C. Após a reação por 4 horas, o pH da mistura reacional foi elevado para 7,5-10 com NaOH 1N para interromper a reação. A mistura reacional é trocada em tamponamento com 30 mM NaCl, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH em torno de 10,5 a 4 °C usando uma membrana de diálise 12-14 KDa. A concentração de proteína da amostra TT-hidrazida resultante foi determinada pelo ensaio de Lowry (ver Pierce Catalog 2003-2004, pág 306) usando albumina de soro bovino como um padrão. O teor de hidrazida foi determinado por meio de ensaio TNBS usando diidrazida de ácido adípico como um padrão, como descrito em Vidal, J. Immunol. Methods 1986; 86: 155-156. O grau de ativação de TT preparado desse modo foi de aproximadamente 50 grupos hidrazida por molécula TT.

##### Ativação de PS Mn A para conter grupos aldeído

[00134]PS Mn A (10 mg/mL em 25 mM HEPES, pH 7,4) foi reagido com 6 mM NaIO<sub>4</sub> a 20-24 °C por 4 horas. A amostra foi dialisada contra 10 mM HEPES, pH 7,4 a 4 °C usando uma membrana de diálise 12-14 KDa. A concentração do PS ativado resultante foi determinada por ensaio fosforoso, como descrito em Keleti e outros, Handbook of micromethods for the biological sciences. 70. Phosphorus (Total). Pág 84. Van Nostrand Reinhold Co. New York, 1974. O teor de aldeído da PS ativado foi determinado por ensaio BCA (Pierce Catalog 2003-2004, págs 241 e 305) usando glicose como um padrão. O grau de ativação do PS Mn A ativado preparado por meio desse protocolo foi de aproximadamente um grupo aldeído por 80 a 110 unidades monoméricas de repetição.

##### Conjugação de PS Mn A ativado para TT ativado

[00135]Uma alíquota de TT contendo hidrazida foi ajustada para 10 mg/mL

por liofilização e dissolução em água. Uma alíquota de PS Mn C contendo aldeído foi ajustada para 10 mg/mL por liofilização e dissolução em 0,2 M HEPES, pH 7,5, 30 mM EDTA. Solução de TT ativado foi acrescentada a igual volume de PS Mn A ativado e turbilhonada. A mistura reacional foi incubada a 20-14 °C por 18 horas. A mistura reacional foi tratada com NaBH<sub>4</sub> (10 vezes equivalente molar para a concentração de aldeído inicial no PS ativado) por 6 horas. A solução foi trocada em tamponamento com solução salina, 10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA usando membrana de corte de peso molecular 12-14 KDa. A proteína total foi determinada pelo ensaio de Lowry (ver Pierce Catalog 2003-2004, pág 306) usando soro de albumina bovina como um padrão. O teor de PS Mn A total foi determinado por ensaio fosforoso, como descrito em Keleti e outros, Handbook of micromethods for the biological sciences. 70. Phosphorus (Total). Pág 84. Van Nostrand Reinhold Co. New York, 1974. Foram feitas diversas preparações de conjugados PS-TT Mn A. O perfil HPSEC de um desses conjugados e do TT ativado são mostrados na Figura 6.

#### Imunogenicidade de conjugados PS-TT Mn A

[00136]Essas preparações de conjugado PS-TT Mn A e PS Mn A nativo (controle) foram separadamente utilizadas para imunizar grupos de 10 ratos a 1 µg polissacarídeo/dose nos dias 0 e 14. As médias geométricas dos níveis de anticorpo induzidos (unidades/mL) duas semanas pós 2ª injeção são 79 unidades/mL para o grupo de controle PS nativo e 11.000-47.000 unidades/mL para os grupos conjugados, considerando 3200 unidades/mL para o soro de referência (Tabela 5). Os conjugados induziram 169-595 vezes mais anticorpo anti-Ps Mn A específicos em ratos como comparado ao controle PS Mn A nativo.

Tabela 5

| Grupos de ratos de diferentes conjugados e polissacarídeos imunogênicos | Média geométrica de nível de anticorpo anti-MCPS, unidades/mL (CI) <sup>a</sup> | Veze de aumento sobre o grupo de controle |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|

|                           |                        |     |
|---------------------------|------------------------|-----|
| cos                       |                        |     |
| PS Mn A nativo (controle) | 79 (21, 290)           | --  |
| MA031209R                 | 14.861 (6542, 33757)   | 188 |
| MA031209B                 | 13.375 (7677, 23303)   | 169 |
| MA031212B                 | 14.777 (5433, 40191)   | 187 |
| MA031212J                 | 13.385 (5150, 34789)   | 169 |
| MA031216B                 | 15.052 (4910, 46149)   | 191 |
| MA031216J                 | 11.074 (4605, 26628)   | 140 |
| MA031219R                 | 20.410 (9282, 44884)   | 258 |
| MA031219B                 | 13.813 (4645, 41071)   | 175 |
| MA031219J                 | 26.826 (9172, 78463)   | 340 |
| MA031221R                 | 18.994 (8012, 45030)   | 240 |
| MA031221B                 | 42.041 (25208, 73147)  | 532 |
| MA031221J                 | 46.981 (20238, 109062) | 595 |

<sup>a</sup>A média geométrica dos níveis de anticorpo anti-PS Mn A (comparado a um soro de referência com nível de anticorpo anti-PS Mn A de 3200 unidades/mL) com 1 intervalo de confiança SD de grupos de ratos (10 ratos por grupo) duas semanas pós 2ª imunização com 1 µg/dose PS Mn A nativo ou cada um dos quatro conjugados PS-TT Mn A.

#### Método B - Conjugado Pneumocócico tipo 6B

#### Ativação de TT para conter grupos hidrazida

[00137]Toxóide do tétano (4,2 mg/mL) foi ativado com 0,42 M hidrazina na presença de 20 mM EDC, 0,1 M MES, pH 6,5 a 20-24 °C. Após a reação por 4 horas, o pH da mistura reacional foi elevado para 7,5-10 com NaOH 1N para interromper a reação. A mistura reacional é trocada em tamponamento com 30 mM NaCl, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH em torno de 10,5 a 4 °C usando uma membrana de diálise 12-14 KDa. A concentração de proteína da amostra TT-hidrazida resultante foi determinada

pelo ensaio de Lowry (ver Pierce Catalog 2003-2004, pág 306) usando albumina de soro bovino como um padrão. O teor de hidrazida foi determinado por meio de ensaio TNBS usando diidrazida de ácido adípico como um padrão, como descrito em Vidal, J. Immunol. Methods 1986; 86: 155-156. O grau de ativação de TT preparado desse modo foi de aproximadamente 50 grupos hidrazida por molécula TT.

#### Ativação de PS Pn 6B para conter grupos cianato

[00138] Polissacarídeo Pn 6B (0,4 mL, 10 mg/mL) foi ativado com 38 µL CDAP (100 mg/mL em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24 °C na presença de 38 µL 0,2 M trietilamina. O polissacarídeo ativado foi misturado com 5 mL 0,2M HEPES frio como gelo, pH 7,5, 30 mM EDTA, e usado imediatamente para conjugação.

#### Conjugação de PS Pn 6B ativada à TT ativado

[00139] O polissacarídeo ativado foi adicionado a 2 mg de TT ativado (frio como gelo, 0,5 mL, 4 mg/mL); turbilhonada. Após incubação a 4 °C com agitação suave por 36 horas, a mistura reacional foi incubada a 20-24 °C por outras 18 horas. A incubação prolongada assegurou a decomposição de quaisquer grupos cianato não reagidos residuais. A solução foi trocada em tamponamento com solução salina, 10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA usando membrana de corte de peso molecular 12-14 KDa. O teor de proteína total é determinado pelo ensaio de Lowry (Pierce Catalog 2003-2004, pág 306), e o teor de polissacarídeo total foi determinado pelo ensaio antrona, como descrito em Keleti e outros, Handbook of micromethods for the biological sciences. 61. Hexoses (Anthrone). Pág 73. Van Nostrand Reinhold Co. New York, 1974. Os perfis HPSEC de TT-PS Pn 6B e o TT ativado são mostrados na Figura 7.

#### Imunogenicidade de conjugado PS-TT Pn 6B

[00140] O conjugado PS-TT Pn 6B como preparado acima e PS Pn 6B nativo (controle) foram separadamente utilizados para imunizar grupos de 10 ratos a 1 µg polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis de

anticorpo induzidos (unidades/mL) duas semanas pós 3ª injeção foram 13 unidades/mL para o grupo de controle PS Pn 6B nativo e 3.700 unidades/mL para o grupo conjugado PS-TT Pn 6B, considerando 3200 unidades/mL para o soro de referência (Tabela 6). O conjugado induziu 285 vezes mais anticorpo anti-PS Pn 6B específico em ratos como comparado ao controle PS Pn 6B nativo.

Tabela 6

| Grupos de ratos de diferentes conjugados e polissacarídeos imunogênicos | Média geométrica de nível de anticorpo anti-MCPS, unidades/mL (CI) <sup>a</sup> | Veze de aumento sobre o grupo de controle |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| PS Pn 6B nativo (controle)                                              | 13 (10, 17)                                                                     | --                                        |
| PS-TT Pn 6B                                                             | 3.700 (240, 5.705)                                                              | 285                                       |

<sup>a</sup>A média geométrica dos níveis de anticorpo anti-PS Pn 6B (comparado a um soro de referência com nível de anticorpo anti-PS Pn 6B de 3200 unidades/mL) com 1 intervalo de confiança SD de grupos de ratos (10 ratos por grupo) duas semanas pós 3ª imunização com 1 µg/dose PS Mn 6B nativa ou cada um dos quatro conjugados PS-TT Pn 6B.

#### Método B - Conjugado pneumocócico tipo 7F

##### Ativação de TT para conter grupos hidrazida

[00141]Toxóide do tétano (4,2 mg/mL) foi ativado com 0,42 M hidrazina na presença de 20 mM EDC, 0,1 M MES, pH 6,5 a 20-24 °C. Após a reação por 4 horas, o pH da mistura reacional foi elevado para 7,5-10 com NaOH 1N para interromper a reação. A mistura reacional é trocada em tamponamento com 30 mM NaCl, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH em torno de 10,5 a 4 °C usando uma membrana de diálise 12-14 KDa. A concentração de proteína da amostra TT-hidrazida resultante foi determinada pelo ensaio de Lowry (ver Pierce Catalog 2003-2004, pág 306) usando albumina de

soro bovino como um padrão. O teor de hidrazida foi determinado por meio de ensaio TNBS usando diidrazida de ácido adípico como um padrão, como descrito em Vidal, J. Immunol. Methods 1986; 86: 155-156. O grau de ativação de TT preparado desse modo foi de aproximadamente 50 grupos hidrazida por molécula TT.

#### Ativação de PS Pn 7F para conter grupos cianato

[00142] Polissacarídeo Pn 7F (0,4 mL, 10 mg/mL) foi ativado com 38 µL CDAP (100 mg/mL em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24 °C em presença de 38 µL 0,2 M trietilamina. O polissacarídeo ativado foi misturado com 5 mL 0,2M HEPES frio como gelo, pH 7,5, 30 mM EDTA, e usado imediatamente para conjugação.

#### Conjugação de PS Pn 7F ativado à TT ativado

[00143] O polissacarídeo ativado foi adicionado a 2 mg de TT ativado (frio como gelo, 0,5 mL, 4 mg/mL); turbilhonada. Após incubação a 4 °C com agitação suave por 36 horas, a mistura reacional foi incubada a 20-24 °C por outras 18 horas. A incubação prolongada assegurou a decomposição de quaisquer grupos cianato não reagidos residuais. A solução foi trocada em tamponamento com solução salina, 10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA usando membrana de corte de peso molecular 12-14 KDa. O teor de proteína total foi determinado pelo ensaio de Lowry (Pierce Catalog 2003-2004, pág 306), e o teor de polissacarídeo total foi determinado pelo ensaio antrona, como descrito em Keleti e outros, Handbook of micromethods for the biological sciences. 61. Hexoses (Anthrone). Pág 73. Van Nostrand Reinhold Co. New York, 1974. Os perfis HPSEC de TT-PS Pn 7F e o TT ativado são mostrados na Figura 8.

#### Imunogenicidade de conjugado PS-TT Pn 7F

[00144] O conjugado PS-TT Pn 7F como preparado acima e PS Pn 7F (controle) foram separadamente utilizados para imunizar grupos de 10 ratos a 1 µg polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis de anticorpo induzidos (unidades/mL) duas semanas pós 3ª injeção foram 17 unidades/mL para o

grupo de controle PS Pn 7F nativo e 17.077 unidades/mL para o grupo conjugado PS-TT Pn 7F, considerando 3200 unidades/mL para o soro de referência (Tabela 7). O conjugado induziu 1.005 vezes mais anticorpo anti-PS Pn 7F específico em ratos como comparado ao controle PS Pn 7F nativo.

Tabela 7

| Grupos de ratos de diferentes e conjugados polissacarídeos imunogênicos | Média geométrica de nível de anticorpo anti-MCPS, unidades/mL (CI) <sup>a</sup> | Veze de aumento sobre o grupo de controle |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| PS Pn 7F nativo (controle)                                              | 17 (14, 20)                                                                     | --                                        |
| PS-TT Pn 7F                                                             | 17.077 (8.034, 36.299)                                                          | 1.005                                     |

<sup>a</sup>A média geométrica dos níveis de anticorpo anti-PS Pn 7F (comparado a um soro de referência com nível de anticorpo anti-PS Pn 7F de 3200 unidades/mL) com 1 intervalo de confiança SD de grupos de ratos (10 ratos por grupo) duas semanas pós 3<sup>a</sup> imunização com 1 µg/dose PS Mn 7F nativa ou cada um dos quatro conjugados PS-TT Pn 7F.

#### Método C - Conjugado pneumocócico sorotipo 9V

##### Ativação de TT para conter grupos aldeído

[00145]Toxóide do tétano (4,2 mg/mL) foi ativado com 0,42 M 1-amino-2,3-propanodiol (APDO) na presença de 20 mM EDC, 0,1 M MES, pH 6,5 a 20-24 °C. Após a reação por 4 horas, o pH da mistura reacional foi elevado para 7,5-10 com NaOH 1N para interromper a reação. A mistura reacional é trocada em tamponamento com 30 mM NaCl, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH em torno de 10,5 a 4 °C usando uma membrana de diálise 12-14 KDa. O grau de modificação TT com APDO é determinado pelo ensaio purpald (como descrito em Lee e outros, Anal. Biochem. 2001; 296: 73-82). Uma alíquota de TT-APDO foi reagida com 6 mM NaIO<sub>4</sub> por 1 hora e

em seguida trocada em tamponamento com 30 mM NaCl,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3 mM, pH em torno de 10,5. O grau de ativação de TT preparado o foi de aproximadamente 26 grupos APDO ou aldeído por molécula TT.

#### Ativação de PS Pn 9V para conter grupos hidrazida

[00146]PS Pn 9V (0,4 mL, 10 mg/mL) foi ativado com 38  $\mu\text{L}$  CDAP (100 mg/mL em acetonitrila) por 2-2,5 minutos a 20-24 °C em presença de 36  $\mu\text{L}$  0,2 M trietilamina. Ao final da ativação, 0,4 mL 0,5 M ADH foi acrescentado e misturado. A mistura reacional foi incubada por 18 horas a 20-24 °C. A amostra foi dialisada contra 10 mM HEPES, pH 7,5 a 4 °C usando uma membrana de diálise 12-14 KDa. A concentração de PS é determinada pelo ensaio antrona, como descrito em Keleti e outros, Handbook of micromethods for the biological sciences. 61. Hexoses (Anthrone). Pág 73. Van Nostrand Reinhold Co. New York, 1974. O teor de hidrazida foi determinado por ensaio TNBS usando diidrazida de ácido adípico como padrão, como descrito em Vidal, J. Immunol. Methods 1986; 86: 155-156. O grau de ativação do PS Pn 9V ativado preparado por meio desse protocolo foi de aproximadamente um grupo hidrazida por unidade de repetição sacarídeo.

#### Conjugação de PS Pn 9V ativado à TT ativado

[00147]Uma alíquota de PS Pn 9V (1 mg; 0,236 mL 4.233 mg/mL) foi misturada com 0,067 mL 1 M HEPES, pH 7,5 e 0,068 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Uma alíquota de TT contendo aldeído (1 mg; 0,296 mL 3,38 mg/mL) foi acrescentada ao PS Pn 9V ativado (volume total, 0,67 mL; concentração inicial para ambos os reagentes, 1,5 mg/mL). A mistura reacional foi incubada a 20-14 °C por 18 horas. A mistura reacional foi tratada com  $\text{NaBH}_4$  (10 vezes equivalente molar para a concentração de aldeído inicial no PS ativado) por 6 horas. A solução foi trocada em tamponamento com solução salina, 10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA usando membrana de corte de peso molecular 12-14 KDa. A proteína total foi determinada pelo ensaio de Lowry (ver Pierce Catalog 2003-2004, pág 306) usando soro de albumina bovina como um padrão. O

teor de total PS Pn 9V foi determinado por ensaio antrona, como descrito em Keleti e outros, Handbook of micromethods for the biological sciences. 61. Hexoses (Antro-na). Pág 73. Van Nostrand Reinhold Co. New York, 1974. Os perfis HPSEC de PS-TT Pn 9V e de TT ativado são mostrados na Figura 9.

#### Imunogenicidade de conjugados PS-TT Pn A

[00148]Esse conjugado PS-TT Pn 9V e PS Pn 9V nativo (controle) foram usados separadamente para imunizar grupos de 10 ratos a 1 µg polissacarídeo/dose nos dias 0, 14 e 28. As médias geométricas dos níveis de anticorpo induzidos (unidades/mL) duas semanas pós 3ª injeção são 15 unidades/mL para o grupo de controle PS-TT Pn 9V nativo e 13.291 unidades/mL para o grupo conjugado TT-PS Pn 9V, considerando 3200 unidades/mL para o soro de referência (Tabela 8). O conjugado induziu 886 vezes mais anticorpo anti-PS Pn 9V específicos em ratos como comparado ao controle PS Pn 9V nativo.

Tabela 8

| Grupos de ratos de diferentes conjugados e polissacarídeos imunogênicos | Média geométrica de nível de anticorpo anti-MCPS, unidades/mL (CI) <sup>a</sup> | Veze de aumento sobre o grupo de controle |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| PS Pn 9V nativo (controle)                                              | 15 (14, 16)                                                                     | --                                        |
| PS-TT Pn 9V                                                             | 13.291 (6.339, 27.869)                                                          | 886                                       |

<sup>a</sup>A média geométrica dos níveis de anticorpo anti-PS Pn 9V (comparado a um soro de referência com nível de anticorpo anti-PS Pn 9V de 3200 unidades/mL) com 1 intervalo de confiança SD de grupos de ratos (10 ratos por grupo) duas semanas pós 3ª imunização com 1 µg/dose PS Mn 9V nativa ou cada um dos quatro conjugados PS-TT Pn 9V.

[00149]Todas as referências mencionadas aqui são incorporadas aqui por referência em suas totalidades. Para o alcance das publicações e patentes ou de

pedidos de patentes incorporados por referência que contradigam a divulgação contida no relatório descritivo, ao relatório descritivo é pretendido sobrepor e/ou ter precedência sobre qualquer material contraditório.

[00150]O termo “compreender” como usado aqui é sinônimo com “incluir”, “conter”, ou “caracterizado por”, e é inclusivo ou em aberto e não exclui elementos adicionais, elementos ou etapas de método não mencionados.

[00151]Todos os números que expressam quantidades de ingredientes, condições de reação, e assim por diante usados no relatório descritivo e reivindicações anexadas são para serem entendidos como estando modificados em todas as instâncias pelo termo “em torno de”. Consequentemente, a menos que indicado o contrário, os parâmetros numéricos apresentados no relatório descritivo e reivindicações anexas são aproximações e podem variar dependendo das propriedades desejadas objetivadas a serem obtidas pela presente invenção. De modo muito objetivo, e não como uma tentativa de limitar a aplicação da doutrina de equivalentes ao escopo das reivindicações, cada parâmetro numérico deverá ser considerado à luz do número de dígitos significativos e das abordagens usuais de arredondamento.

[00152]A descrição acima revela vários métodos e materiais da presente invenção. Essa invenção é suscetível a modificações nos métodos e materiais, bem como alterações nos métodos de fabricação e equipamentos. Tais modificações serão evidentes para aqueles versados na técnica a partir de uma consideração dessa revelação ou da prática da invenção aqui revelada. Consequentemente, não é pretendido que a invenção esteja limitada às modalidades específicas aqui reveladas, mas que ela cubra a totalidade das modificações e alternativas que venham a se inserir no verdadeiro escopo e espírito da invenção como materializado nas reivindicações anexas.

### REIVINDICAÇÕES

1. Método para a preparação de uma vacina conjugada, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

reagir um polissacarídeo com um agente oxidante, por meio do qual uma solução de um polissacarídeo aldeído-ativado é obtida;

trocar o tamponamento da solução do polissacarídeo aldeído-ativado para um pH de cerca de 7 a cerca de 8;

reagir uma proteína com hidrazina ou diidrazida do ácido adípico na presença de cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida a um pH de cerca de 6 a cerca de 7, por meio do qual uma solução de uma proteína hidrazida-ativada é obtida;

eleva um pH da solução da proteína hidrazida-ativada para de cerca de 7,0 a cerca de 11;

trocar o tamponamento da solução da proteína hidrazida-ativada para um pH de cerca de 10,0 a cerca de 11,0;

reagir o polissacarídeo aldeído-ativado com a proteína hidrazida-ativada a um pH de cerca de 6 a cerca de 8, por meio do qual um conjugado compreendendo uma ou mais ligações duplas C=N é obtido; e

reduzir substancialmente a totalidade das ligações duplas C=N do conjugado para ligações simples C-N, por meio do qual uma vacina conjugada capaz de estimular uma resposta imune é obtida.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente oxidante compreende  $\text{NaIO}_4$ .

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a solução do polissacarídeo aldeído-ativado é trocada em tamponamento com um tampão HEPES.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a solução da proteína hidrazida-ativada é trocada em tamponamento com um tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polissacarídeo aldeído-ativado é reagido com a proteína hidrazida-ativada a uma proporção de cerca de 1:2 a cerca de 2:1.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que reduzir compreende reduzir com  $\text{NaBH}_4$ .

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos Meningocócicos, polissacarídeos Pneumocócicos, polissacarídeo de *Hemophilus influenzae* tipo b, polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, e polissacarídeos Streptococcus do grupo B.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM<sub>197</sub>, e proteína meningocócica.

Figura 1

Comparação entre o Método A de conjugação e uma conjugação por aminação re-  
 dutora convencional por meio de HPSEC a 280 nm utilizando uma coluna Waters  
 Ultrahydrogel 2000

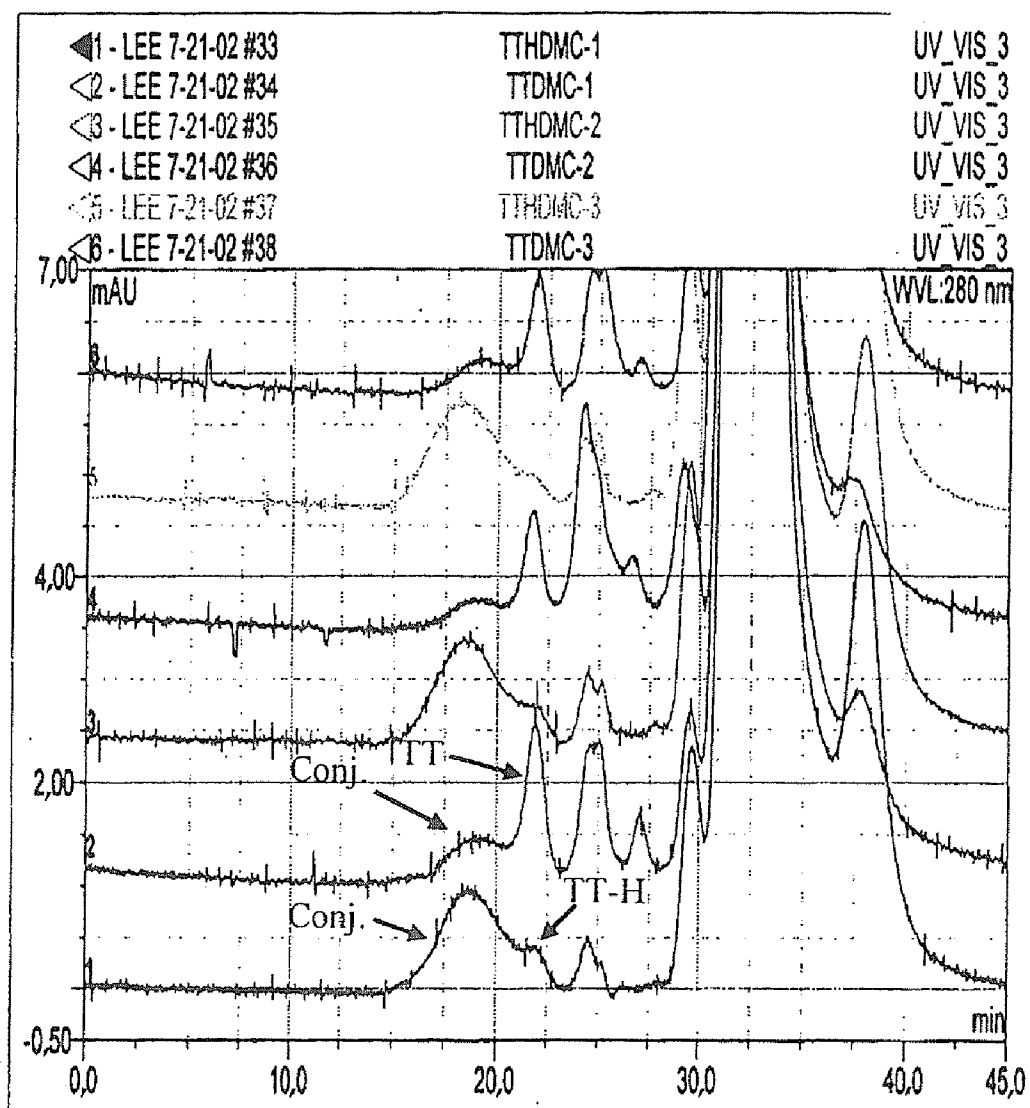


Figura 2

Efeito de um agente de bloqueio sobre o rendimento de conjugados preparados pelo Método B e analisados por HPSEC a 280 nm usando uma coluna Waters Ultrahydrogel 2000

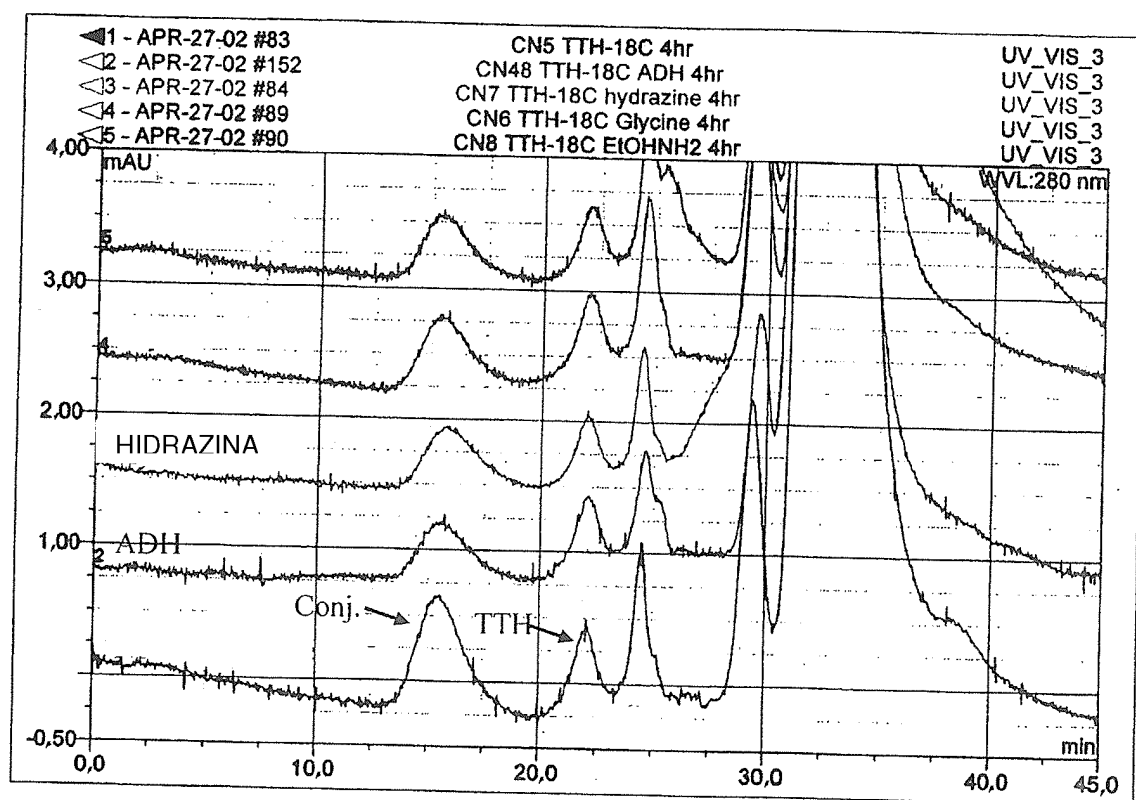


Figura 3

Perfis HPSEC de quatro conjugados PS-TT Mn C preparados por conjugação Método A a 280 nm usando uma coluna Waters Ultrahydrogel 2000

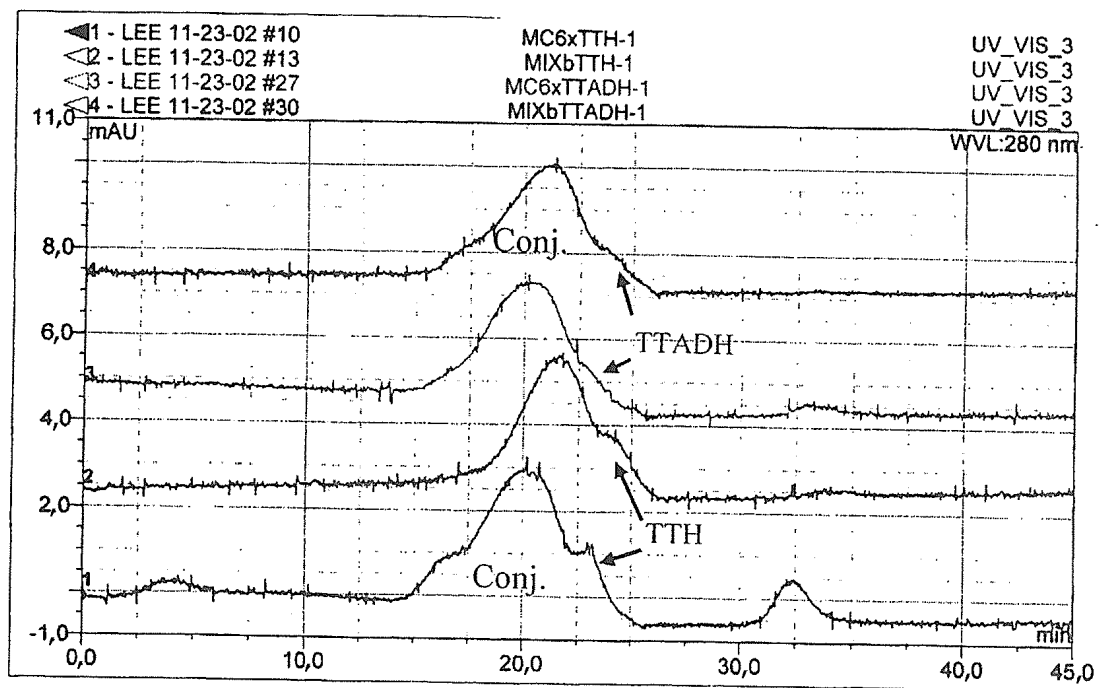


Figura 4

Avaliação de polissacarídeo livre em um produto conjugado PS-TT Mn C preparado por conjugação Método A e analisado por HPSEC usando uma coluna Waters Ultrahydrogel 2000

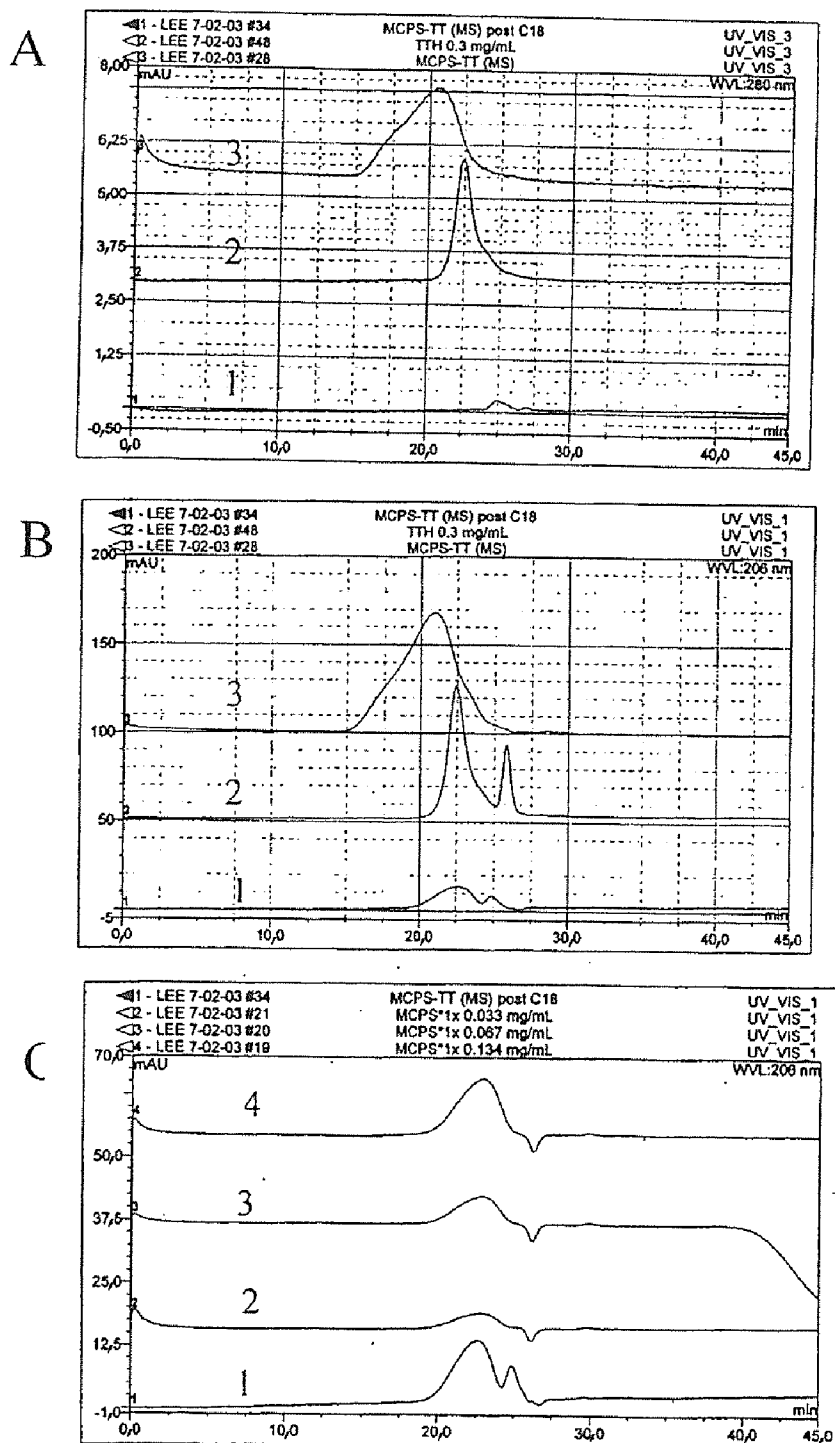


Figura 5

Quantificação de PS livre no produto conjugado PS-TT Mn C  
preparado pelo Método A

Determinação por concentração por HPSEC usando áreas de pico  
de concentrações padrões

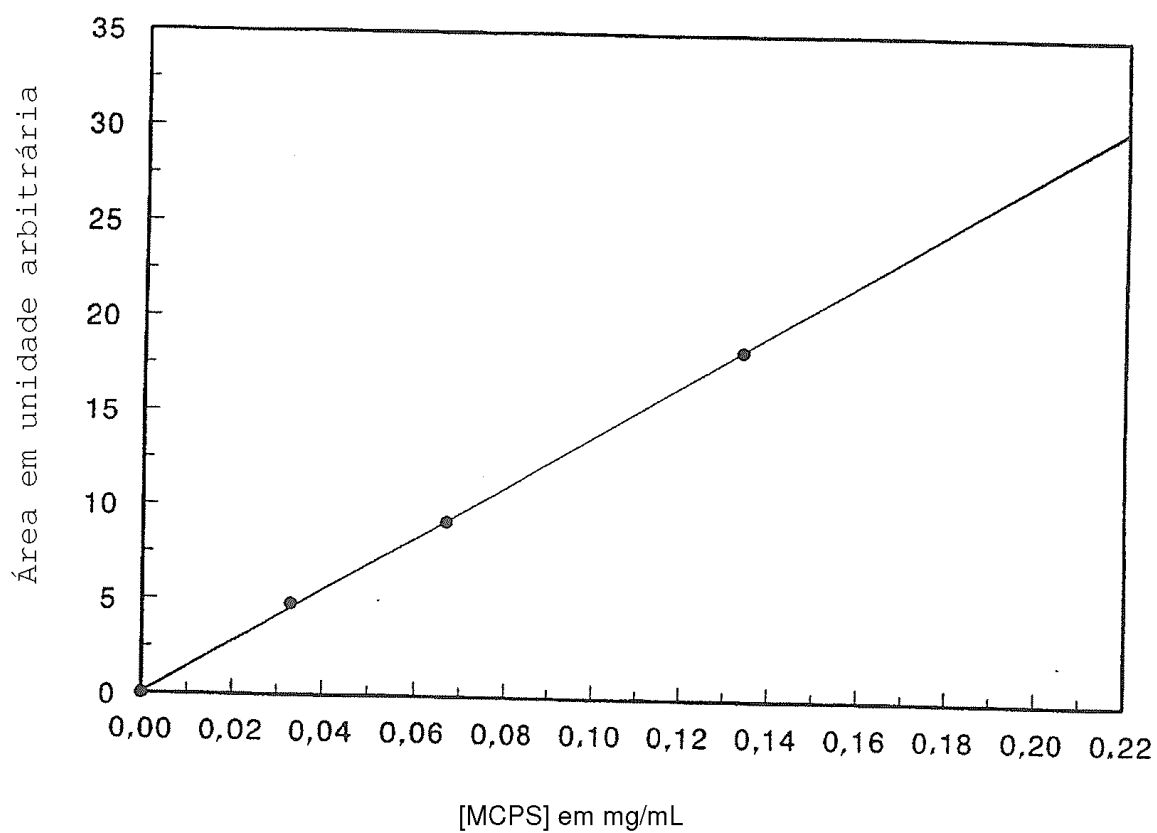


Figura 6

Perfis HPSEC (280 nm) de conjugado PS-TT Mn A MA031219R preparado pelo Método A e TTH usando uma coluna Waters Ultrahydrogel Linear

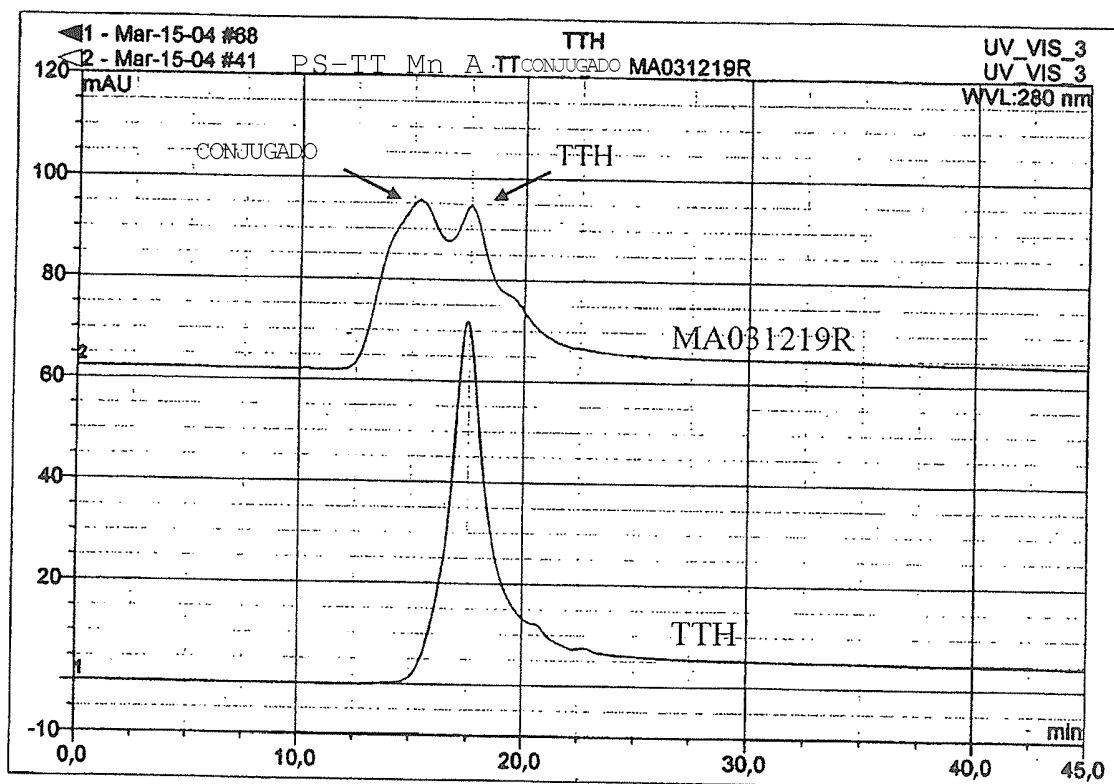


Figura 7

Perfis HPSEC (280 nm) de conjugado PS-TT Pn 6B preparado pelo Método B e TTH usando uma coluna Waters Ultrahydrogel Linear

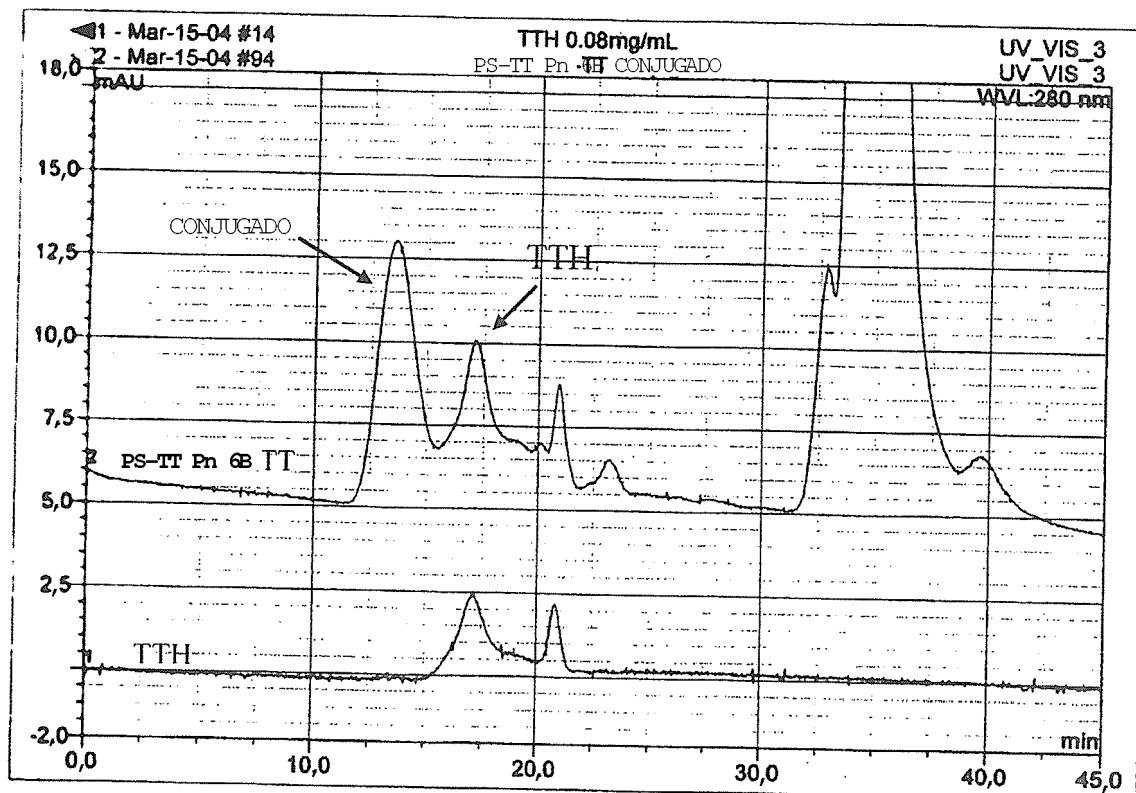


Figura 8

Perfis HPSEC (280 nm) de conjugado PS-TT Pn 7F preparado pelo Método B e TTH usando uma coluna Waters Ultrahydrogel Linear

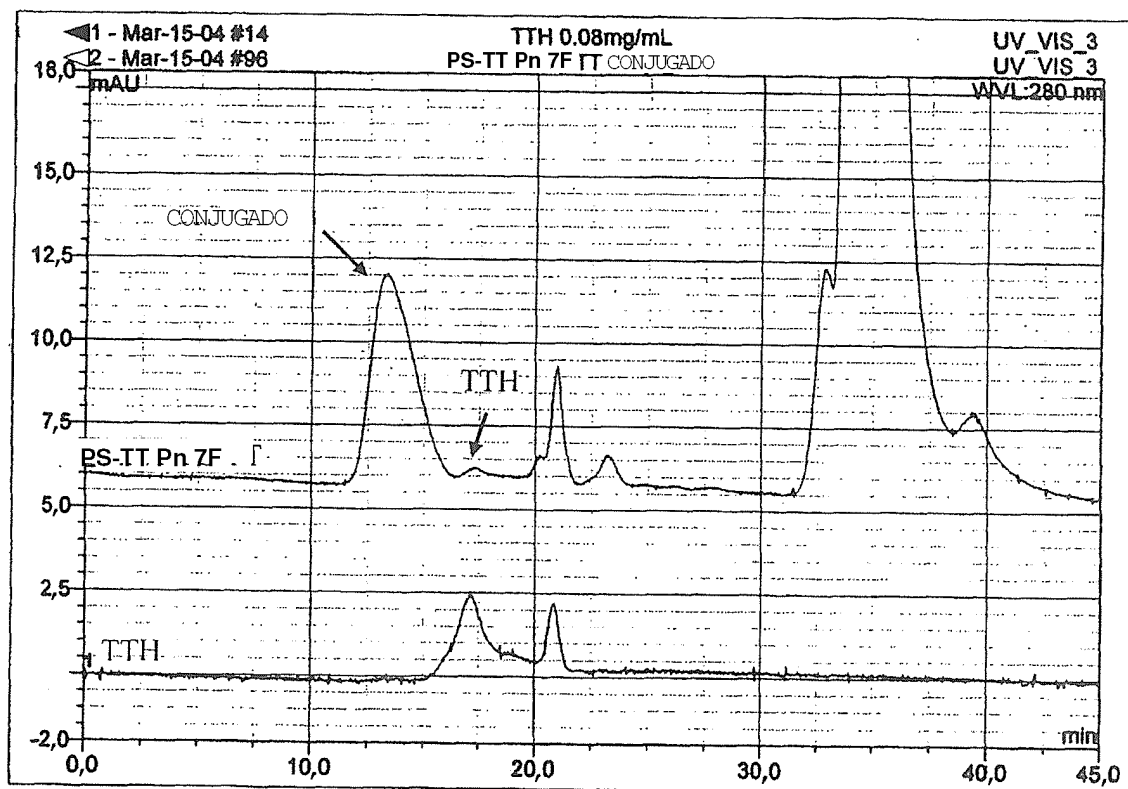
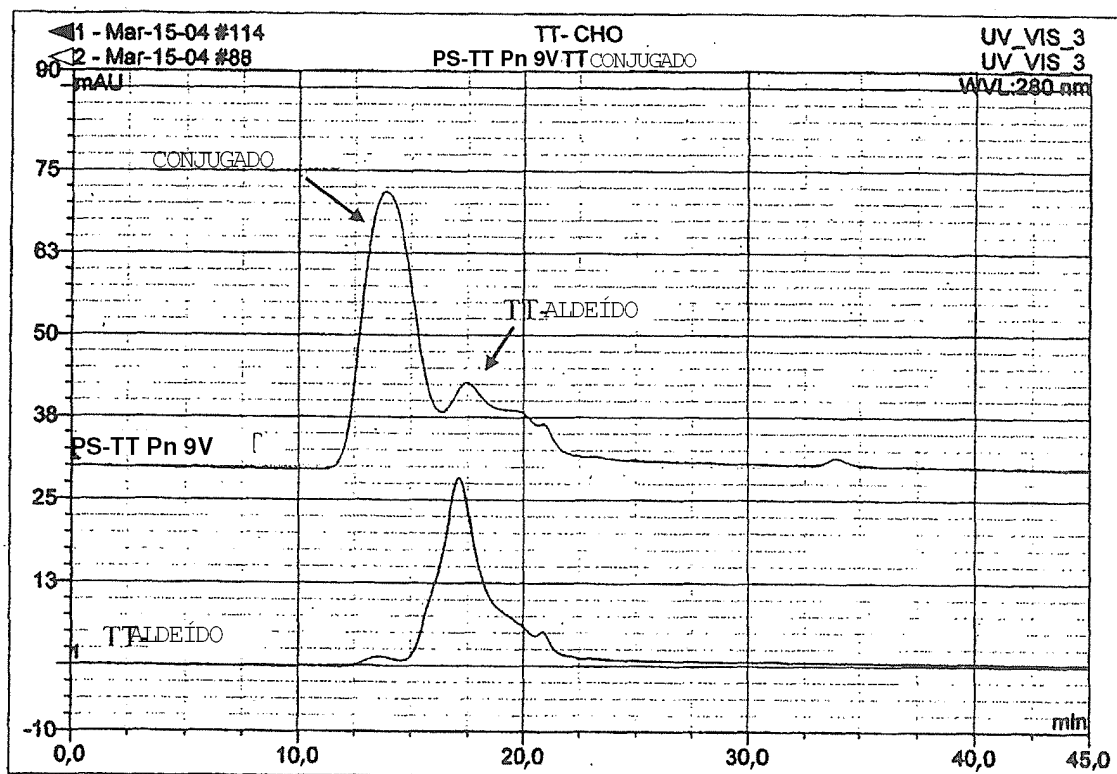


Figura 9

Perfis HPSEC (280 nm) de conjugado PS-TT Pn 9V preparado pelo Método C e TT-aldeído usando uma coluna Waters Ultrahydrogel Linear



### RESUMO

#### “MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VACINA CONJUGADA DE POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA”

São providos métodos para a síntese e a fabricação de vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína de alto rendimento. Os métodos envolvem a reação de um grupo hidrazida sobre um reagente com um grupo éster aldeído ou cianato sobre o outro reagente. A reação procede rapidamente com uma alta eficiência de conjugação, tal que um processo simplificado de purificação pode ser empregado para separar o produto conjugado da não conjugada proteína e polissacarídeo e outros subprodutos de molécula pequena.