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

(11) PI 0620193-8 B1

(22) Data do Depósito: 20/12/2006

(45) Data de Concessão: 31/12/2019

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E VACINA A COMPREENDENDO, BEM COMO PROCESSO PARA PREPARAR A VACINA

(51) Int.Cl.: A61K 39/09.

(30) Prioridade Unionista: 07/04/2006 GB 0607088.2; 07/04/2006 GB 0607087.4; 12/10/2006 GB 0620336.8; 12/10/2006 GB 0620337.6; 12/12/2006 GB PC/GB2006/004634; (...).

(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A..

(72) Inventor(es): JAN POOLMAN; RALPH LEON BIEMANS; NATHALIE MARIE-JOSEPHE GARCON; PHILIPPE VINCENT HERMAND; MARCELLE PAULETTE VAN MECHELEN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2006069977 de 20/12/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/071710 de 28/06/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/06/2008

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, PROCESSO PARA PREPARAR A VACINA, MÉTODO PARA IMUNIZAR UM HOSPEDEIRO HUMANO CONTRA DOENÇA CAUSADA POR INFECÇÃO POR STREPTOCOCCUS PNEUMONIÃE, E, USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGENICA OU VACINA A presente invenção descreve uma composição imunogênica compreendendo conjugados de sacarídeo capsular de S. pneumoniae de sorotipos 19A e 19F, em que 19A é conjugado a um primeiro toxóide bacteriano e 19F é conjugado a um segundo toxóide bacteriano. Vacinas, métodos para fazer vacinas e usos das vacinas também são descritos.

"COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E VACINA A COMPREENDENDO, BEM COMO PROCESSO PARA PREPARAR A VACINA"

Campo da Invenção

A presente invenção se refere a uma vacina melhorada para Streptococcus pneumoniae.

Fundamentos da invenção

Crianças com menos do que 2 anos de idade não montam uma resposta imune para a maioria de vacinas de polissacarídeo, então tem sido necessário tornar os polissacarídeos imunogênicos por conjugação química a um carreador protéico. Acoplar o polissacarídeo, um antígeno independente de T, a uma proteína, um antígeno dependente de T, confere ao polissacarídeo as propriedades de dependência de T incluindo troca de isotipo, maturação de afinidade, e indução de memória.

Entretanto, podem existir questões com administração repetida de conjugados polissacarídeo-proteína, ou a combinação de conjugados polissacarídeo-proteína para formar vacinas multivalentes. Por exemplo, foi relatado que uma vacina de polissacarídeo tipo b (PRP) de Haemophilus influenzae usando toxóide de tétano (TT) como o carreador protéico foi testada em um intervalo de dosagem com imunização simultânea com TT (livre) e uma vacina de polissacarídeo pneumocócico conjugado a TT seguindo um programa de bebê padrão. Na medida em que a dosagem da vacina pneumocócica foi aumentada, a resposta imune à porção de polissacarídeo PRP da vacina conjugada de Hib foi diminuída, indicando interferência imune do polissacarídeo, possivelmente através do uso da mesma proteína carreadora (Dagan et al., Infect Immun. (1998); 66: 2093-2098)

O efeito da dosagem de carreador-proteína na resposta humoral para a própria proteína também provou ser multifacetado. Em bebês humanos foi relatado que aumentar a dosagem de um conjugado de toxóide de

tétano tetravalente resultou em uma resposta diminuída ao carreador de tétano (Dagan et a!. supra). Análise clássica destes efeitos de vacinas de combinação foi descrita como supressão epitópica induzida por carreador, o que não é completamente entendido, mas acredita-se que resulte de uma quantidade em excesso de proteína carreadora (Fattom, Vaccine 17: 126 (1999)). Isto parece resultar em competição para células Th, pelas células B para a proteína carreadora, e células B para o polissacarídeo. Se as células B para a proteína carreadora predominam, não existem células Th suficientes disponíveis para fornecer a ajuda necessária para as células B específicas para o polissacarídeo. Entretanto, os efeitos imunológicos observados têm sido inconsistentes, com a quantidade total de proteína carreadora em algumas instâncias aumentando a resposta imune, e em outros casos diminuindo a resposta imune.

Portanto permanecem dificuldades técnicas para combinar conjugados de múltiplos polissacarídeos em uma única, eficaz, formulação de vacina.

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva responsável por morbidade e mortalidade considerável (particularmente nos jovens e idosos), causando doenças invasivas tal como pneumonia, bacteriemia e meningite, e doenças associadas com colonização, tal como Otite média aguda. A taxa de pneumonia pneumocócica nos Estados Unidos da América para pessoas com mais de 60 anos de idade é estimada como sendo de 3 a 8 por 100.000. Em 20% dos casos isto leva a bacteriemia, e outras manifestações tal como meningite, com uma taxa de mortalidade perto de 30% mesmo com tratamento com antibiótico.

Pneumococcus é encapsulado com um polissacarídeo quimicamente ligado que confere especificidade de sorotipo. Existem 90 sorotipos conhecidos de pneumococos, e a cápsula é o determinante de virulência de princípio para pneumococos, pois a cápsula não apenas protege a superfície interna das bactérias de complemento, mas é por si só fracamente

imunogênica. Polissacarídeos são antígenos independentes de T, e não podem ser processados ou apresentados em moléculas de MHC para interagir com células T. Eles podem entretanto, estimular o sistema imune através de um mecanismo substituto que envolve reticulação de receptores de superfície em células B.

Foi mostrado em diversos experimentos que proteção contra doença pneumocócica invasiva é correlacionada mais fortemente com anticorpo específico para a cápsula, e a proteção é específica para sorotipo.

Streptococcus pneumoniae é a causa mais comum de doença bacteriana invasiva e Otite média em bebês e crianças jovens. Da mesma maneira, os idosos montam respostas fracas a vacinas pneumocócicas [Roghmann et at., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], por isso a incidência aumentada de pneumonia bacteriana nesta população [Verghese and Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

Assim é um objetivo da presente invenção desenvolver uma formulação melhorada de uma vacina conjugada de polissacarídeo de Streptococcus pneumoniae de múltiplos sorotipos.

Breve descrição de Figuras

Figura 1 Gráfico de barras mostrando imunogenicidade de conjugado de 11 valências em macacos Rhesus idosos. As barras mais claras representam o GMC depois de duas inoculações com conjugado de 11 valências em adjuvante de fosfato de alumínio. As barras mais escuras representam o GMC depois de duas inoculações com conjugado de 11 valências em adjuvante C.

Figura 2 Gráfico de barras mostrando células B de memória para PS3 depois de inoculação com o conjugado de 11 valências em adjuvante C ou adjuvante de fosfato de alumínio.

Figura 3 Gráfico de barras mostrando imunogenicidade de anti polissacarídeo 19F em camundongos Balb/C para os polissacarídeos

plenos de 4 valências e os conjugados de dPly de 4 valências.

Figura 4 Gráfico de barras mostrando imunogenicidade anti polissacarídeo 22F em camundongos Balb/C para os polissacarídeos plenos de 4 valências e os conjugados de PhtD de 4 valências.

Figura 5 Gráfico de barras mostrando resposta de IgG anti-22F em camundongos Balb/c.

Figura 6 Gráfico de barras mostrando títulos de opsonofagocitose de anti-22F em camundongos Balb/c.

Figura 7 Gráfico de barras comparando respostas de IgG induzidas em camundongos C57B1 jovens depois de imunização com vacina conjugada de 13 valências formulada em diferentes adjuvantes.

Figura 8 Gráfico de barras mostrando a eficácia protetora de diferentes combinações de vacinas em um modelo de pneumonia de macaco.

Figura 9 Gráfico de barras mostrando resposta de IgG anti PhtD em camundongos Balb/c depois de imunização com conjugados 22F-PhtD ou 22F-AH-PhtD.

Figura 10 Proteção contra desafio pneumocócico tipo 4 em camundongos depois de imunização com 22F-PhtD ou 22F-AH-PhtD.

Descrição da Invenção

A presente invenção fornece uma composição imunogênica compreendendo conjugados de sacarídeo capsular de Streptococcus pneumoniae de sorotipos 19A e 19F caracterizada pelo fato de que 19A é conjugado a uma proteína carreadora que é um primeiro toxóide bacteriano e 19F é conjugado a uma proteína carreadora que é um segundo toxóide bacteriano.

O termo sacarídeo capsular inclui polissacarídeos capsulares e oligossacarídeos deriváveis do polissacarídeo capsular. Um oligossacarídeo contém pelo menos 4 resíduos de açúcar. Os termos conjugado e conjugados se referem a um sacarídeo capsular covalentemente ligado a uma proteína

carreadora.

Para os propósitos desta invenção, "imunizar um hospedeiro humano contra exacerbações de COPD" ou "tratamento ou prevenção de exacerbações de COPD" ou "redução em severidade de exacerbações de COPD" se refere a uma redução em incidência ou taxa de exacerbações de COPD (por exemplo uma redução em taxa de 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20% ou mais), por exemplo dentro de um grupo de pacientes imunizado com as composições ou vacinas da invenção.

O termo toxóide bacteriano inclui toxinas bacterianas que são inativadas ou por mutação genética, por tratamento químico ou por conjugação. Toxóides bacterianos adequados incluem toxóide de tétano, toxóide de difteria, toxóide de pertussis, citolisinas bacterianas ou pneumolisina.

Foram descritas mutações de pneumolisina (Ply) que diminuem a toxicidade de pneumolisina (Patente Internacional 90/06951, Patente Internacional 99/03884). Similarmente, mutações genéticas de toxina de difteria que diminuem sua toxicidade são conhecidas (veja abaixo). Análogos geneticamente destoxificados de toxina de difteria incluem CRM197 e outros mutantes descritos em Patente Norte-Americana 4.709.017, Patente Norte-Americana 5.843.711, Patente Norte-Americana 5.601.827, e Patente Norte-Americana 5.917.017. CRM197 é uma forma da toxina de difteria mas é 'imunologicamente indistinguível da toxina de difteria. CRM197 é produzido por C. diphtheriae infectado pela p197tox de fase não toxigênica criada por mutagênese de nitrosoguanidina do carinefago b toxigênico (Uchida et al Nature New Biology (1971) 233; 8-11). A proteína CRM197 tem o mesmo peso molecular que a toxina de difteria mas difere dela por uma única mudança de base no gene estrutural. Isto leva a uma mudança de aminoácido de glicina por glutamina em posição 52 o que torna fragmento A incapaz de se ligar a NAD e portanto não tóxico (Pappenheimer

1977, Ann Rev, Biochem. 46; 69-94, Rappuoli Applied and Environmental Microbiology Sept 1983 p560-564).

O primeiro e segundo toxóide bacteriano podem ser os mesmos ou diferentes. Onde o primeiro e segundo toxóide bacteriano são diferentes, isto significa que eles têm uma seqüência de aminoácidos diferente.

Por exemplo, 19A e 19F podem ser conjugados a toxóide de tétano e toxóide de tétano; toxóide de difteria e toxóide de difteria; Crm197 e CRM197, pneumolisina e pneumolisina, toxóide de tétano e toxóide de difteria; toxóide de tétano e CRM197; toxóide de tétano e pneumolisina; toxóide de difteria e toxóide de tétano; toxóide de difteria e CRM197, toxóide de difteria e pneumolisina; CRM197 e toxóide de tétano, CRM197 e toxóide de difteria; CRM197 e pneumolisina; Pneumolisina e toxóide de tétano; pneumolisina e toxóide de difteria; ou pneumolisina e CRM197 respectivamente.

Em uma forma de realização, em adição a conjugados de sacarídeos de S. pneumoniae 19A e 19F, a composição imunogênica compreende adicionalmente conjugados de sacarídeos capsulares de S. pneumoniae 4, 6B, 9V, 14, 18C e 23F.

Em uma forma de realização, em adição a conjugados de sacarídeos de S. pneumoniae 19A e 19F, a composição imunogênica compreende adicionalmente conjugados de sacarídeos capsulares de S. pneumoniae 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C e 23F.

Em uma forma de realização, em adição a conjugados de sacarídeos de S. pneumoniae 19A e 19F, a composição imunogênica compreende adicionalmente conjugados de sacarídeos capsulares de S. pneumoniae 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F e 23F.

Em uma forma de realização, em adição a conjugados de sacarídeos de S. pneumoniae 19A e 19F, a composição imunogênica

compreende adicionalmente conjugados de sacarídeos capsulares de S. pneumoniae 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F e 23F.

Em uma forma de realização, em adição a conjugados de sacarídeos de S. pneumoniae 19A e 19F, a composição imunogênica compreende adicionalmente conjugados de sacarídeos capsulares de S. pneumoniae 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F e 23F.

Tipicamente a vacina de Streptococcus pneumoniae da presente invenção irá compreender antígenos de sacarídeo capsular (opcionalmente conjugados), caracterizada pelo fato de que os sacarídeos são derivados de pelo menos dez sorotipos de S. pneumoniae. O número de sacarídeos capsulares de S. pneumoniae pode variar de 10 sorotipos diferentes (ou "V", valências) a 23 sorotipos diferentes (23V). Em uma forma de realização existem 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 sorotipos diferentes. Em outra forma de realização da invenção, a vacina pode compreender sacarídeos conjugados de S. pneumoniae e sacarídeos não conjugados de S. pneumoniae. Opcionalmente, o número total de sorotipos de sacarídeo é menor do que ou igual a 23. Por exemplo, a invenção pode compreender 10 sorotipos conjugados e 13 sacarídeos não conjugados. De uma maneira similar, a vacina pode compreender 11, 12, 13, 14 ou 16 sacarídeos conjugados e 12, 11, 10, 9 ou 7 respectivamente, sacarídeos não conjugados.

Em uma forma de realização a vacina pneumocócica multivalente da invenção será selecionada a partir dos seguintes sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, embora seja percebido que um ou dois outros sorotipos podem ser substituídos dependendo da idade do destinatário recebendo a vacina e da localização geográfica onde a vacina será administrada. Por exemplo, uma vacina com 10 valências pode compreender polissacarídeos de sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Uma vacina com 11 valências também pode incluir sacarídeos de sorotipo 3. Uma

vacina pediátrica (bebê) com 12 ou 13 valências também pode incluir a formulação com 11 valências suplementada com sorotipos 6A e 19A, ou 6A e 22F, ou 19A e 22F, ou 6A e 15B, ou 19A e 15B, ou 22F e 15B, ao passo que uma vacina para idoso com 13 valências pode incluir a formulação com 10 ou 11 valências suplementada com sorotipos 19A e 22F, 8 e 12F, ou 8 e 15B, ou 8 e 19A, ou 8 e 22F, ou 12F e 15B, ou 12F e 19A, ou 12F e 22F, ou 15B e 19A, ou 15B e 22F. Uma vacina pediátrica com 14 valências pode incluir a formulação com 10 valências descrita acima suplementada com sorotipos 3, 6A, 19A e 22F; sorotipos 6A, 8, 19A e 22F; sorotipos 6A, 12F, 19A e 22F; sorotipos 6A, 15B, 19A e 22F; sorotipos 3, 8, 19A e 22F; sorotipos 3, 12F, 19A e 22F; sorotipos 3, 15B, 19A e 22F; sorotipos 3, 6A, 8 e 22F; sorotipos 3, 6A, 12F e 22F; ou sorotipos 3, 6A, 15B e 22F.

A composição em uma forma de realização inclui sacarídeos capsulares derivados de sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F (opcionalmente conjugados). Em uma forma de realização adicional da invenção pelo menos 11 antígenos de sacarídeos (opcionalmente conjugados) são incluídos, por exemplo sacarídeos capsulares derivados de sorotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Em uma forma de realização adicional da invenção, pelo menos 12 ou 13 antígenos de sacarídeos são incluídos, por exemplo uma vacina pode compreender sacarídeos capsulares derivados de sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F ou sacarídeos capsulares derivados de sorotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F e 23F, embora antígenos de sacarídeos adicionais, por exemplo de 23 valências (tal como 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), também sejam contemplados pela invenção.

A vacina da presente invenção pode compreender proteína D (PD) de Haemophilus influenzae (veja e.g. Patente Européia 0594610). Haemophilus influenzae é um organismo causador chave de otite média, e os

presentes requerentes mostraram que incluir esta proteína em uma vacina para Streptococcus pneumoniae irá fornecer um nível de proteção contra Haemophilus influenzae relacionada à otite média (publicação POET de referência). Em uma forma de realização, a composição de vacina compreende proteína D. Em um aspecto, PD está presente como uma proteína carreadora para um ou mais dos sacarídeos. Em outro aspecto, proteína D pode estar presente na composição de vacina como uma proteína livre. Em um aspecto adicional, proteína D está presente tanto como uma proteína carreadora quanto como proteína livre. Proteína D pode ser usada como uma proteína de comprimento completo ou como um fragmento (Patente Internacional 0056360). Em um aspecto adicional, proteína D está presente como uma proteína carreadora para a maioria dos sacarídeos, por exemplo 6, 7, 8, 9 ou mais dos sacarídeos podem ser conjugados a proteína D. Neste aspecto, proteína D também pode estar presente como proteína livre.

A vacina da presente invenção compreende dois ou mais tipos diferentes de proteína carreadora. Cada tipo de proteína carreadora pode atuar como carreador para mais do que um sacarídeo, cujos sacarídeos podem ser os mesmos ou diferentes. Por exemplo, sorotipos 3 e 4 podem ser conjugados à mesma proteína carreadora, ou à mesma molécula de proteína carreadora ou a diferentes moléculas da mesma proteína carreadora. Em uma forma de realização, dois ou mais sacarídeos diferentes podem ser conjugados à mesma proteína carreadora, ou à mesma molécula de proteína carreadora ou a diferentes moléculas da mesma proteína carreadora.

Quaisquer sacarídeos capsulares de Streptococcus pneumoniae presentes na composição imunogênica da invenção exceto 19A e 19F podem ser conjugados a uma proteína carreadora independentemente selecionada a partir do grupo consistindo de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, PhtD, PhtBE ou fusões PhtDE (particularmente descritas em Patente Internacional 01/98334 e Patente Internacional 03/54007), pneumolisina destoxificada e

proteína D. Uma lista mais completa de proteínas carreadoras que podem ser usadas nos conjugados da invenção está apresentada abaixo.

A proteína carreadora conjugada a um ou mais dos sacarídeos capsulares de S. pneumoniae nos conjugados presentes nas composições imunogênicas da invenção opcionalmente é um membro das proteínas da família de tríade de polihistidina (Pht), fragmentos ou proteínas de fusão destas. As proteínas PhtA, PhtB, PhtD ou PhtE podem ter uma seqüência de aminoácidos compartilhando 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% de identidade com uma seqüência descrita em Patente Internacional 00/37105 ou Patente Internacional 00/39299 (e.g. com seqüência de aminoácidos 1-838 ou 21-838 de SEQ ID NO: 4 de Patente Internacional 00/37105 para PhtD). Por exemplo, proteínas de fusão são compostas de comprimento completo ou fragmentos de 2, 3 ou 4 de PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Exemplos de proteínas de fusão são PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E. PhtD/A. PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B e PhtE/D, caracterizado pelo fato de que as proteínas são ligadas com a primeira mencionada no término (veja por exemplo Patente Internacional 01/98334).

Onde fragmentos de proteínas Pht são usados (separadamente ou como parte de uma proteína de fusão), cada fragmento opcionalmente contém um ou mais motivo(s) de tríade de histidina e/ou regiões de super-enrolamento de tais polipeptídeos. Um motivo de tríade de histidina é a porção de polipeptídeo que tem a seqüência HxxHxH onde H é histidina e x é um aminoácido outro do que histidina. Uma região de super-enrolamento é uma região prevista por algoritmo "Coils" Lupus, A et al (1991) Science 252; 1162-1164. Em uma forma de realização o ou cada fragmento inclui um ou mais motivo de tríade de histidina assim como pelo menos uma região de super-enrolamento. Em uma forma de realização, o ou cada fragmento contém exatamente ou pelo menos 2, 3, 4 ou 5 motivos de tríade de histidina (opcionalmente, com seqüência de Pht nativa entre as 2 ou mais tríades, ou

seqüência intra-tríade que é mais do que 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 % idêntica a uma seqüência de Pht intra-tríade pneumocócica nativa– e.g. a seqüência intra-tríade mostrada em SEQ ID NO: 4 de Patente Internacional 00/37105 para PhtD). Em uma forma de realização, o ou cada fragmento contém exatamente ou pelo menos 2, 3 ou 4 regiões de super-enrolamento. Em uma forma de realização uma proteína Pht descrita neste lugar inclui a proteína de comprimento completo com a seqüência sinal acoplada, a proteína de comprimento completo madura com o peptídeo sinal (por exemplo 20 aminoácidos em término N) removido, variantes naturalmente ocorrentes de proteína Pht e fragmentos imunogênicos de proteína Pht (e.g. fragmentos como descritos acima ou polipeptídeos compreendendo pelo menos 15 ou 20 aminoácidos contíguos de uma seqüência de aminoácidos em Patente Internacional 00/37105 ou Patente Internacional 00/39299 caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é capaz de obter uma resposta imune específica para dita seqüência de aminoácidos em Patente Internacional 00/37105 ou Patente Internacional 00/39299).

Em particular, o termo “PhtD" como usado neste lugar inclui a proteína de comprimento completo com a seqüência sinal acoplada, a proteína de comprimento completo madura com o peptídeo sinal (por exemplo 20 aminoácidos em término N) removido, variantes naturalmente ocorrentes de PhtD e fragmentos imunogênicos de PhtD (e.g. fragmentos como descritos acima ou polipeptídeos compreendendo pelo menos 15 ou 20 aminoácidos contíguos de uma seqüência de aminoácidos de PhtD em Patente Internacional 00/37105 ou Patente Internacional 00/39299 caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é capaz de obter uma resposta imune específica para dita seqüência de aminoácidos de PhtD em Patente Internacional 00/37105 ou Patente Internacional 00/39299 (e.g. SEQ ID NO: 4 de Patente Internacional 00/37105 para PhtD).

Se a proteína carreadora é a mesma para 2 ou mais sacarídeos

na composição, os sacarídeos podem ser conjugados à mesma molécula da proteína carreadora (moléculas carreadoras tendo 2 mais sacarídeos diferentes conjugado a ela) [veja por exemplo Patente Internacional 04/083251]. Alternativamente os sacarídeos podem ser cada separadamente conjugados a diferentes moléculas da proteína carreadora (cada molécula da proteína carreadora tendo apenas um tipo de sacarídeo conjugado a ela).

Exemplos de proteínas carreadoras que podem ser usadas na presente invenção são DT (Toxóide de difteria), TT (toxóide de tétano) ou fragmento C de TT, DT CRM197 (um mutante de DT) outros mutantes pontuais de DT, tal como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 e CRM107 e outras mutações descritas por Nicholls e Youle em Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; deleção ou mutação de Glu-148 para Asp, Gln ou Ser e/ou Ala 158 para Gly e outras mutações descritas em Patente Norte-Americana 4709017 ou Patente Norte-Americana 4950740; mutação de pelo menos um ou mais resíduos Lys 516, Lys 526, Phe 530 e/ou Lys 534 e outras mutações descritas em Patente Norte-Americana 5917017 ou Patente Norte-Americana 6455673; ou fragmento descrito em Patente Norte-Americana 5843711, pneumolisina pneumocócica (Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13) incluindo ply destoxificada de alguma maneira por exemplo dPLY-GMBS (Patente Internacional 04081515, PCT/EP2005/010258) ou dPLY-formol, PhtX, incluindo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE e fusões de proteínas Pht por exemplo fusões PhtDE, fusões PhtBE (Patente Internacional 01/98334 e Patente Internacional 03/54007), (Pht A-E são descritas em mais detalhe abaixo) OMPC (proteína de membrana meningocócica exterior – normalmente extraída de N. meningitidis sorogrupo B – Patente Européia 0372501), PorB (de N. meningitidis), PD (proteína D de Haemophilus influenzae – veja, e.g., Patente Européia 0 594 610 B), ou equivalentes imunologicamente funcionais destas, peptídeos sintéticos

(Patente Européia 0378881, Patente Européia O427347), proteínas de choque térmico (WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (Patente Internacional 98/58668, Patente Européia O471177), citocinas, linfocinas, fatores de crescimento ou hormônios (Patente Internacional 91/01146), proteínas artificiais compreendendo múltiplos epítopos humanos de CD4+ célula T de vários antígenos derivados de patógeno (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tal como proteína N19 (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7) proteína de superfície pneumocócica PspA (Patente Internacional 02/091998), proteínas de absorção de ferro (Patente Internacional 01/72337), toxina A ou B de C. difficile (Patente Internacional 00/61761).

Nurkka et al Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11):1008-14, 2004 Nov. descreveram uma vacina pneumocócica de 11 valências com todos os sorotipos conjugados a PD. Entretanto, os presentes requerentes mostraram que atividade opsonofagocítica foi melhorada para anticorpos induzidos com conjugados tendo 19F conjugado a DT comparado com 19F conjugado a PD. Em adição, os presentes requerentes mostraram que uma maior reatividade cruzada para 19A é vista com 19F conjugado a DT. Portanto é uma característica da composição da presente invenção que sorotipo 19F seja conjugado a um toxóide bacteriano, por exemplo TT, pneumolisina, DT ou CRM 197. Em um aspecto, sorotipo 19F é conjugado a DT. Também é uma característica da invenção que sorotipo 19A seja conjugado a um toxóide bacteriano, por exemplo TT, pneumolisina, DT ou CRM 197. Os sorotipos de sacarídeos remanescentes da composição imunogênica podem ser todos conjugados a uma ou mais proteínas carreadoras que não são DT (i.e. apenas 19F é conjugado a DT), ou podem ser separados entre uma ou mais proteínas carreadoras que não são DT e DT para si própria. Em uma forma de realização, 19F é conjugado a DT ou CRM 197 e todos os sorotipos remanescentes são conjugados a PD. Em uma forma de

realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM 197, e os sorotipos remanescentes são separados entre PD, e TT ou DT ou CRM 197. Em uma forma de realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM 197 e não mais do que um sacarídeo é conjugado a TT. Em um aspecto desta forma de realização, dito um sacarídeo é 18C ou 12F. Em uma forma de realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM 197 e não mais do que dois sacarídeos são conjugados a TT. Em uma forma de realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM 197, e os sorotipos remanescentes são separados entre PD, TT e DT ou CRM 197. Em uma forma de realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM 197, e os sorotipos remanescentes são separados entre PD, TT e pneumolisina. Em uma forma de realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM 197, e os sorotipos remanescentes são separados entre PD, TT e CRM 197. Em uma forma de realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM197 e os sorotipos remanescentes são separados entre PD, TT, pneumolisina e opcionalmente PhtD ou proteína de fusão PhtD/E. Em uma forma de realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM197, 19A é conjugado a pneumolisina ou TT e os sorotipos remanescentes são separados entre PD, TT, pneumolisina e opcionalmente PhtD ou proteína de fusão PhtD/E. Em uma forma de realização adicional, 19F é conjugado a DT ou CRM197, 19A é conjugado a pneumolisina ou TT, um sacarídeo adicional é conjugado a TT, um sacarídeo adicional é conjugado a PhtD ou PhtD/E e todos os sacarídeos adicionais são conjugados a PD. Em uma forma de realização adicional 19F é conjugado a DT ou CRM197, 19A é conjugado a pneumolisina, um sacarídeo adicional é conjugado a TT, um sacarídeo adicional é conjugado a pneumolisina, 2 sacarídeos adicionais são conjugados a PhtD ou PhtD/E e todos os sacarídeos adicionais são conjugados a PD.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende proteína D de Haemophilus influenzae. Dentro desta

forma de realização, se PD não é uma das proteínas carreadoras usadas para conjugar quaisquer outros sacarídeos do que 19F, por exemplo 19F é conjugado a DT enquanto que os outros sorotipos são conjugados a uma ou mais proteínas carreadoras diferentes que não são PD, então PD estará presente na composição de vacina como proteína livre. Se PD é uma das proteínas carreadoras usadas para conjugar outros sacarídeos do que 19F, então PD opcionalmente pode estar presente na composição de vacina como proteína livre.

O termo “sacarídeo" ao longo deste relatório pode indicar polissacarídeo ou oligossacarídeo e inclui ambos. Polissacarídeos são isolados de bactérias e podem ser dimensionados em certo grau por métodos conhecidos (veja por exemplo Patente Européia 497524 e Patente Européia 497525) e opcionalmente por microfluidização. Polissacarídeos podem ser dimensionados a fim de reduzir viscosidade em amostras de polissacarídeo e/ou para melhorar filtrabilidade para produtos conjugados. Oligossacarídeos têm um baixo número de unidades repetidas (tipicamente 5-30 unidades repetidas) e tipicamente são polissacarídeos hidrolisados

Polissacarídeos capsulares de Streptococcus pneumoniae compreendem unidades repetidas de oligossacarídeos que podem conter até 8 resíduos de açúcar. Para uma revisão das unidades de oligossacarídeos para os sorotipos chave de Streptococcus pneumoniae veja JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Ciénc., June 2005, vol.77, no.2, p.293-324. ISSN 0001-3765. Em uma forma de realização, um antígeno de sacarídeo capsular pode ser um polissacarídeo de comprimento completo, entretanto em outras ele pode ser uma unidade de oligossacarídeo, ou uma cadeia de sacarídeo mais curta do que nativa de unidades repetidas de oligossacarídeos. Em uma forma de realização, todos os sacarídeos presentes na vacina são polissacarídeos. Polissacarídeos de comprimento completo podem ser "dimensionados" i.e. seu

tamanho pode ser reduzido por vários métodos tal como tratamento com hidrólise ácida, tratamento com peróxido de hidrogênio, dimensionamento por emulsiflex® seguido por um tratamento com peróxido de hidrogênio para gerar fragmentos de oligossacarídeo ou microfluidização.

Observou-se que o foco da arte foi usar oligossacarídeos para facilidade de produção de conjugado. Os requerentes encontraram que usando conjugados de polissacarídeos nativos ou levemente dimensionados, uma ou mais das seguintes vantagens pode ser percebida: 1) um conjugado tendo alta imunogenicidade que é filtrável, 2) a proporção de polissacarídeo para proteína no conjugado pode ser alterada de forma que a proporção de polissacarídeo para proteína (p/p) no conjugado pode ser aumentada (o que pode ter um efeito no efeito de supressão de carreador), 3) conjugados imunogênicos propensos a hidrólise podem ser estabilizados pelo uso de sacarídeos maiores para conjugação. O uso de polissacarídeos maiores pode resultar em mais reticulação com o carreador conjugado e pode diminuir a liberação de sacarídeo livre do conjugado. As vacinas conjugadas descritas na arte anterior tendem a despolimerizar os polissacarídeos antes de conjugação a fim de melhorar conjugação. Os presentes requerentes encontraram que vacinas conjugadas de sacarídeos retendo um tamanho maior de sacarídeo podem fornecer uma boa resposta imune contra doença pneumocócica.

A composição imunogênica da invenção pode assim compreender um ou mais conjugados de sacarídeos caracterizada pelo fato de que o tamanho médio (peso molecular de peso médio; Mw) de cada sacarídeo antes de conjugação é acima de 80kDa, 100kDa, 200kDa, 300kDa, 400kDa, 500kDa ou 1000kDa. Em uma forma de realização o conjugado após conjugação deve ser prontamente filtrável através de um filtro de 0,2 mícron de forma que um rendimento de mais do que 50, 60, 70, 80, 90 ou 95% é obtido após filtração comparado com a amostra pré-filtração.

Para os propósitos da invenção, "polissacarídeo nativo" se

refere a um sacarídeo que não foi sujeito a um processo, o propósito do qual é reduzir o tamanho do sacarídeo. Um polissacarídeo pode se tornar levemente reduzido em tamanho durante procedimentos normais de purificação. Um tal sacarídeo ainda é nativo. Apenas se o polissacarídeo foi sujeito a técnicas de dimensionamento o polissacarídeo não deve ser considerado nativo.

Para os propósitos da invenção, "dimensionados por um fator até 2x" significa que o sacarídeo é sujeito a um processo pretendido para reduzir o tamanho do sacarídeo mas para reter um tamanho maior do que metade do tamanho do polissacarídeo nativo. 3X, 4x etc. são para serem interpretados da mesma maneira i.e. o sacarídeo é sujeito a um processo pretendido para reduzir o tamanho do polissacarídeo mas para reter um tamanho mais do que um terço, um quarto etc. o tamanho do polissacarídeo nativo.

Em um aspecto da invenção, a composição imunogênica compreende sacarídeos de Streptococcus pneumoniae de pelo menos 10 sorotipos conjugados a uma proteína carreadora, caracterizado pelo fato de que pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou cada sacarídeo de S. pneumoniae é polissacarídeo nativo.

Em um aspecto da invenção, a composição imunogênica compreende sacarídeos de Streptococcus pneumoniae de pelo menos 10 sorotipos conjugados a uma proteína carreadora, caracterizado pelo fato de que pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou cada sacarídeo de S. pneumoniae é dimensionado por um fator até 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x ou 10x. Em uma forma de realização deste aspecto, a maioria dos sacarídeos, por exemplo 6, 7, 8 ou mais dos sacarídeos são dimensionados por um fator até 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x ou 10x.

O peso molecular ou peso molecular médio de um sacarídeo neste lugar se refere ao peso molecular ponderal médio (M_w) do sacarídeo medido antes de conjugação e é medido por MALLS.

A técnica MALLS é bem conhecida na arte e tipicamente é realizada como descrito em exemplo 2. Para análise MALLS de sacarídeos pneumocócicos, duas colunas (TSKG6000 e 5000PWx1) podem ser usadas em combinação e os sacarídeos são eluídos em água.

Sacarídeos são detectados usando um detector de dispersão luminosa (por exemplo Wyatt Dawn DSP equipado com um laser de argônio de 10mW a 488nm) e um refratômetro inferométrico (por exemplo Wyatt Otilab DSP equipado com uma bateria P100 e um filtro vermelho a 498nm).

Em uma forma de realização os sacarídeos de S. pneumoniae são polissacarídeos nativos ou polissacarídeos nativos que foram reduzidos em tamanho durante um processo normal de extração.

Em uma forma de realização, os sacarídeos de S. pneumoniae são dimensionados por clivagem mecânica, por exemplo por microfluidização ou sonicação. Microfluidização e sonicação têm a vantagem de diminuir o tamanho dos polissacarídeos nativos maiores suficientemente para fornecer um conjugado filtrável. Dimensionamento é por um fator de não mais do que 2x0, 10x, 8x, 6x, 5x, 4x, 3x ou 2x.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica compreende conjugados de S. pneumoniae que são feitos a partir de uma mistura de polissacarídeo nativos e sacarídeos que são dimensionados por um fator de não mais do que 2x0. Em um aspecto desta forma de realização, a maioria dos sacarídeos, por exemplo 6, 7, 8 ou mais dos sacarídeos são dimensionados por um fator de até 2x, 3x, 4x, 5x ou 6x.

Em uma forma de realização, o sacarídeo de Streptococcus pneumoniae é conjugado à proteína carreadora através de um ligante, por exemplo um ligante bifuncional. O ligante é opcionalmente heterobifuncional ou homobifuncional, tendo por exemplo um grupo amino reativo e um grupo ácido carboxílico reativo, 2 grupos amino reativos ou dois grupos ácido carboxílico reativos. O ligante tem por exemplo entre 4 e 20, 4 e 12, 5 e 10

átomos de carbono. Um ligante possível é ADH. Outros ligantes incluem B-propionamido (Patente Internacional 00/10599), nitrofenil-etilamina (Geyer et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haloalquil haletos (Patente Norte-Americana 4057685), ligações glicosídicas (Patente Norte-Americana 4673574, Patente Norte-Americana 4808700), hexano diamina e ácido 6-aminocapróico (Patente Norte-Americana 4459286). Em uma forma de realização, ADH é usado como um ligante para conjugar sacarídeo de sorotipo 18C.

Os conjugados de sacarídeos presentes nas composições imunogênicas da invenção podem ser preparados por qualquer técnica de acoplamento conhecida. O método de conjugação pode recorrer à ativação do sacarídeo com 1-ciano-4-dimetilamino piridínio tetrafluoroborato (CDAP) para formar um éster de cianato. O sacarídeo ativado pode assim ser acoplado diretamente ou através de um grupo espaçador (ligante) a um grupo amino na proteína carreadora. Por exemplo, o espaçador pode ser cistamina ou cisteamina para gerar um polissacarídeo tiolado que pode ser acoplado ao carreador através de uma ligação de tioéter obtida depois de reação com uma proteína carreadora ativada por maleimida (por exemplo usando GMBS) ou uma proteína carreadora haloacetilada (por exemplo usando iodoacetimida [e.g. etil iodoacetimida HCl] ou N-succinimidil bromoacetato ou STAB, ou SIA, ou SBAP). Opcionalmente, o éster de cianato (opcionalmente feito por química de CDAP) é acoplado com hexano diamina ou ADH e o sacarídeo derivado de amino é conjugado à proteína carreadora usando química de carbodiimida (e.g. EDAC ou EDC) através de um grupo carboxílico na proteína carreadora. Tais conjugados são descritos em pedido publicado de PCT WO 93/15760 Uniformed Services University e Patente Internacional 95/08348 e Patente Internacional 96/29094

Outras técnicas adequadas usam carbodiimidas, carbiinidas, hidrazidas, ésteres ativos, norbornano, ácido pnitrobenzóico, N-

hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muitas são descritas em Patente Internacional 98/42721. Conjugação pode envolver um ligante de carbonila que pode ser formado por reação de um grupo hidroxila livre do sacarídeo com CDI (Bethell et al J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn et al J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18) seguido por reação de com uma proteína para formar uma ligação de carbamato. Isto pode envolver redução do término anomérico para um grupo hidroxila primário, proteção/desproteção opcional do grupo hidroxila primário' reação do grupo hidroxila primário com CDI para formar um intermediário de CDI carbamato e acoplar o intermediário de CDI carbamato com um grupo amino em uma proteína.

Os conjugados também pode ser preparados por métodos diretos de aminação redutora como descrito em Patente Norte-Americana 4365170 (Jennings) e Patente Norte-Americana 4673574 (Anderson). Outros métodos são descritos em Patente Européia -0-161-188, Patente Européia - 208375 e Patente Européia-0-477508.

Um método adicional envolve o acoplamento de um sacarídeo ativado por brometo de cianogênio (ou CDAP) derivado com diidrazida ácida adípica (ADH) ao carreador protéico por condensação com Carbodiimida (Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256), por exemplo usando EDAC.

Em uma forma de realização, um grupo hidroxila (opcionalmente um grupo hidroxila ativado por exemplo um grupo hidroxila ativado para fazer um éster de cianato [e.g. com CDAP]) em um sacarídeo é ligado a um grupo amino ou carboxílico em uma proteína ou diretamente ou indiretamente (através de um ligante). Onde um ligante está presente, um grupo hidroxila em um sacarídeo opcionalmente é ligado a um grupo amino em um ligante, por exemplo usando conjugação de CDAP. Um grupo amino adicional no ligante por exemplo ADH) pode ser conjugado a um grupo ácido carboxílico em uma proteína, por exemplo usando química de carbodiimida, por exemplo usando EDAC. Em uma forma de realização, o(s) sacarídeo(s)

capsular(es) pneumocócico(s) é(são) conjugado(s) ao ligante primeiro antes do ligante ser conjugado à proteína carreadora. Alternativamente o ligante pode ser conjugado ao carreador antes de conjugação ao sacarídeo.

Uma combinação de técnicas também pode ser usada, com alguns conjugados sacarídeo-proteína sendo preparados por CDAP, e alguns por aminação redutora.

Em geral os seguintes tipos de grupos químicos em um carreador protéico podem ser usados para acoplamento/conjugação:

A) Carboxila (por exemplo através de ácido aspártico ou ácido glutâmico). Em uma forma de realização este grupo é ligado a grupos amino em sacarídeos diretamente ou a um grupo amino em um ligante com química de carbodiimida e.g. com EDAC.

B) Grupo amino (por exemplo através de lisina). Em uma forma de realização este grupo é ligado a grupos carboxila em sacarídeos diretamente ou a um grupo carboxílico em um ligante com química de carbodiimida e.g. com EDAC. Em outra forma de realização este grupo é ligado a grupos hidroxila ativados com CDAP ou CNBr em sacarídeos diretamente ou a tais grupos em um ligante; a sacarídeos ou ligantes tendo um grupo aldeído; a sacarídeos ou ligantes tendo um grupo éster de succinimida.

C) Sulfidrila (por exemplo através de cisteína). Em uma forma de realização este grupo é ligado a um sacarídeo de bromo ou cloro acetilado ou ligante com química de maleimida. Em uma forma de realização este grupo é ativado/modificado com bis diazobenzidina.

D) Grupo hidroxila (por exemplo através de tirosina). Em uma forma de realização este grupo é ativado/modificado com bis diazobenzidina.

E) Grupo imidazolila (por exemplo através de histidina). Em uma forma de realização este grupo é ativado/modificado com bis diazobenzidina.

F) Grupo guanidila (por exemplo através de arginina).

G) Grupo indolila (por exemplo através de triptofano).

Em um sacarídeo, em geral os seguintes grupos podem ser usados para um acoplamento: OH, COOH ou NH2. Grupos aldeído podem ser gerados depois de diferentes tratamentos conhecidos na arte tal como: periodato, hidrólise ácida, peróxido de hidrogênio, etc.

Abordagens de acoplamento direto:

Sacarídeo-OH + CNBr ou CDAP -----> éster de cianato + NH2-Prot ----> conjugado

Sacarídeo-aldeído + NH2-Prot ----> base Schiff + NaCNBH3 ----> conjugado

Sacarídeo-COOH + NH2-Prot + EDAC ----> conjugado

Sacarídeo-NH2 + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

Abordagens de acoplamento direto através de um espaçador (ligante):

Sacarídeo-OH + CNBr ou CDAP ---> éster de cianato + NH2----NH2 ----> sacarídeo---NH2 + COOH-Prot + EDAC -----> conjugado

Sacarídeo-OH + CNBr ou CDAP ----> éster de cianato + NH2SH-----> sacarídeo-----SH + SH-Prot (Proteína nativa com uma cisteína exposta ou obtida depois de modificação de grupos amino da proteína por SPDP por exemplo) -----> sacarídeo-S-S-Prot

Sacarídeo-OH + CNBr ou CDAP ---> éster de cianato + NH2----SH ---------- > sacarídeo----SH+ maleimida-Prot (modificação de grupos amino) ----> conjugado

Sacarídeo-OH + CNBr ou CDAP ---> éster de cianato + NH2----SH ---> Sacarídeo-SH + Prot haloacetilada ----> Conjugado

Sacarídeo-COOH + EDAC + NH2 ----- NH2 ---> sacarídeo ---------- NH2 + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Sacarídeo-COOH + EDAC+ NH2----SH > sacarídeo----SH +

SH-Prot (Proteína nativa com uma cisteína exposta ou obtida depois de modificação de grupos amino da proteína por SPDP por exemplo) ---> sacarídeo-S-S-Prot

Sacarídeo-COOH + EDAC+ NH2----SH -----> sacarídeo----SH + maleimida-Prot (modificação de grupos amino) ----> conjugado

Sacarídeo-COOH + EDAC + NH2----SH ---> Sacarídeo-SH + Prot haloacetilada ----> Conjugado

Sacarídeo-Aldeído + NH2 ----- NH2 ----> sacarídeo---NH2 + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Observação: ao invés de EDAC acima, qualquer carbodiimida adequada pode ser usada.

Em resumo, os tipos de grupo químico de carreador protéico que podem ser geralmente usados para acoplamento com um sacarídeo são grupos amino (por exemplo em resíduos de lisina), grupos COOH (por exemplo em resíduos de ácido aspártico e glutâmico) e grupos SH (se acessíveis) (por exemplo em resíduos de cisteína)

Opcionalmente a proporção de proteína carreadora para sacarídeo de S. pneumoniae é entre 1:5 e 5:1; 1:2 e 2,5:1; 1:1 e 2:1 (wlw). Em uma forma de realização, a maioria dos conjugados, por exemplo 6, 7, 8, 9 ou mais dos conjugados têm uma proporção de proteína carreadora para sacarídeo que é maior do que 1:1, por exemplo 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1 ou 1,6:1.

Em uma forma de realização, pelo menos um sacarídeo de S. pneumoniae é conjugado a uma proteína carreadora através de um ligante usando CDAP e EDAC. Por exemplo, 18C ou pode ser conjugado a uma proteína através de um ligante (por exemplo aqueles com dois grupos hidrazino em suas extremidades tal como ADH) usando CDAP e EDAC como descrito acima. Quando um ligante é usado, CDAP pode ser usado para conjugar o sacarídeo a um ligante e EDAC então pode ser usado para

conjugar o ligante a uma proteína ou, alternativamente EDAC pode ser usado primeiro para conjugar o ligante à proteína, depois do que CDAP pode ser usado para conjugar o ligante ao sacarídeo.

Em geral, a composição imunogênica da invenção pode compreender uma dose de cada conjugado de sacarídeos entre 0,1 e 20μg, 1 e 10μg ou 1 e 3μg de sacarídeo.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção contém cada sacarídeo capsular de S. pneumoniae em uma dose de entre 0,1-20μg; 0,5-10μg; 0,5- 5μg ou 1-3μg de sacarídeo. Em uma forma de realização, sacarídeos capsulares podem estar presentes em diferentes dosagens, por exemplo alguns sacarídeos capsulares podem estar presentes em uma dose de exatamente 1μg ou alguns sacarídeos capsulares podem estar presentes em uma dose de exatamente 3μg. Em uma forma de realização, sacarídeos de sorotipos 3, 18C e 19F (ou 4, 18C e 19F) estão presentes em uma dose maior do que outros sacarídeos. Em um aspecto desta forma de realização, sorotipos 3, 18C e 19F (ou 4, 18C e 19F) estão presentes em uma dose de cerca de ou exatamente 3 μg enquanto que outros sacarídeos na composição imunogênica estão presentes em uma dose de cerca de ou exatamente 1μg.

"Cerca de" ou 'aproximadamente" são definidos como dentro de 10% mais ou menos da figura dada para os propósitos da invenção.

Em uma forma de realização, pelo menos um dos sacarídeos capsulares de S. pneumoniae é diretamente conjugado a uma proteína carreadora. Opcionalmente o pelo menos um dos sacarídeos capsulares de S. pneumoniae é diretamente conjugado por CDAP. Em uma forma de realização, a maioria dos sacarídeos capsulares por exemplo 5, 6, 7, 8, 9 ou mais são diretamente ligados à proteína carreadora por CDAP (veja Patente Internacional 95/08348 e Patente Internacional 96/29094)

A composição imunogênica pode compreender proteínas de

Streptococcus pneumoniae, neste lugar denominadas proteínas de Streptococcus pneumoniae da invenção. Tais proteínas podem ser usadas como proteínas carreadoras, ou podem estar presentes como proteínas livres, ou podem estar presentes tanto como proteínas carreadoras quanto como proteínas livres. As proteínas de Streptococcus pneumoniae da invenção são ou expostas em superfície, pelo menos durante parte do ciclo de vida do pneumococo, ou são proteínas que são secretadas ou liberadas pelo pneumococo. Opcionalmente as proteínas da invenção são selecionadas a partir das seguintes categorias, tal como proteínas tendo um motivo de seqüência sinal tipo II de LXXC (onde X é qualquer aminoácido, e.g., a família de tríade de polihistidina (PhtX)), proteínas de ligação de colina (CbpX), proteínas tendo um motivo de seqüência sinal tipo I (e.g., Sp101), proteínas tendo um motivo LPXTG (onde X é qualquer aminoácido, e.g., Sp128, Sp130), e toxinas (e.g., Ply). Exemplos preferidos dentro destas categorias (ou motivos) são as proteínas seguintes, ou equivalentes imunologicamente funcionais destas.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende pelo menos 1 proteína selecionada a partir do grupo consistindo da família de Tríade de Poli Histidina (PhtX), família de Proteína de Ligação de Colina (CbpX), truncados de CbpX, família LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas truncada de CbpX-truncada de LytX (ou fusões), pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 e Sp133. Em uma forma de realização adicional, a composição imunogênica compreende 2 ou mais proteínas selecionadas a partir do grupo consistindo da família de Tríade de Poli Histidina (PhtX), família de Proteína de Ligação de Colina (CbpX), truncados de CbpX, família LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas truncada de CbpX-truncada de LytX (ou fusões), pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, e Sp128. Em mais uma forma de realização, a composição imunogênica compreende 2 ou mais proteínas selecionadas a partir do grupo

consistindo da família de Tríade de Poli Histidina (PhtX), família de Proteína de Ligação de Colina (CbpX), truncados de CbpX, família LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas truncada de CbpX-truncada de LytX (ou fusões), pneumolisina (Ply), e Sp128.

A família Pht (Tríade de Poli Histidina) compreende proteínas PhtA, PhtB, PhtD, e PhtE. A família é caracterizada por uma seqüência de lipidação, dois domínios separados por uma região rica em prolina e diversas tríades de histidina, possivelmente envolvidas em ligação metálica ou de nucleosídeo ou atividade enzimática, (3-5) regiões de super-enrolamento, um término N conservado e um término C heterogêneo. Ela está presente em todas as linhagens de pneumococos testadas. Proteínas homólogas também foram encontradas em outros Streptococcus e Neisseria. Em uma forma de realização da invenção, a proteína Pht da invenção é PhtD. É entendido, entretanto, que os termos Pht A, B, D, e E se referem a proteínas tendo seqüências descritas nas citações abaixo assim como variantes naturalmente ocorrentes (e fabricadas pelo homem) destas que têm uma homologia de seqüência que é pelo menos 90% idêntica às proteínas referenciadas. Opcionalmente ela é pelo menos 95% idêntica ou pelo menos 97% idêntica.

Com respeito às proteínas PhtX, PhtA é descrita em Patente Internacional 98/18930, e também é referida como Sp36. Como observado acima, ela é uma proteína da família de tríade de polihistidina e tem o motivo sinal tipo II de LXXC. PhtD é descrita em Patente Internacional 00/37105, e também é referida como Sp036D. Como observado acima, também é uma proteína da família de tríade de polihistidina e tem o motivo sinal LXXC tipo II. PhtB é descrita em Patente Internacional 00/37105, e também é referida como Sp036B. Outro membro da família de PhtB é o Polipeptídeo Degradador de C3, como descrito em Patente Internacional 00/17370. Esta proteína também é da família de tríade de polihistidina e tem o motivo sinal LXXC tipo II. Por exemplo, um equivalente imunologicamente funcional

preferido é a proteína Sp42 descrita em Patente Internacional 98/18930. Um truncado de PhtB (aproximadamente 79kD) é descrito em Patente Internacional 99/15675 que também é considerado um membro da família de PhtX. PhtE é descrita em Patente Internacional 00/30299 e é referida como BVH-3. Onde qualquer proteína Pht é referida neste lugar, é pretendido que fragmentos imunogênicos ou fusões destes da proteína Pht possam ser usados. Por exemplo, uma referência a PhtX inclui fragmentos imunogênicos ou fusões destes de qualquer proteína Pht. Uma referência a PhtD ou PhtB também é uma referência a fusões PhtDE ou PhtBE como encontrado, por exemplo, em Patente Internacional 0198334.

Pneumolisina é uma toxina multifuncional com atividades citolíticas (hemolíticas) e de ativação de complemento distintas (Rubins et al., Am . Respi. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)). A toxina não é secretada por pneumococos, mas ela é liberada mediante lise de pneumococos sob a influência de autolisina. Seus efeitos incluem e.g., a estimulação da produção de citocinas inflamatórias por monócitos humanos, a inibição dos batimentos de cílios em epitélio respiratório humano, e a diminuição de atividade bactericida e migração de neutrófilos. O efeito mais óbvio de pneumolisina é na lise de células sanguíneas vermelhas, o que envolve ligação a colesterol. Devido ao fato dela ser uma toxina, ela precisa ser destoxificada (i.e., não tóxica para um humano quando fornecida em uma dosagem adequada para proteção) antes dela pode ser administrada in vivo. Expressão e clonagem de pneumolisina tipo selvagem ou nativa é conhecida na arte. Veja, por exemplo, Walker et al. (Infect Immun, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) e Mitchell et al (NAR, 18:4010 (1990)). Destoxificação de ply pode ser conduzida por meios químicos, e.g., sujeito a tratamento com formalina ou glutaraldeído ou uma combinação de ambos (Patente Internacional 04081515, PCT/EP2005/010258). Tais métodos são bem conhecidos na arte para várias toxinas. Alternativamente, ply pode ser

geneticamente destoxificado. Assim, a invenção abrange derivados de proteínas pneumocócicas que podem ser, por exemplo, proteínas mutadas. O termo “mutada" é usado neste lugar para significar uma molécula que passou por deleção, adição ou substituição de um ou mais aminoácidos usando técnicas bem conhecidas para mutagênese sítio dirigida ou qualquer outro método convencional. Por exemplo, como descrito acima, uma proteína ply mutante pode ser alterada de forma que ela seja biologicamente inativa enquanto que ainda mantendo seus epítopos imunogênicos, veja, por exemplo, Patente Internacional 90/06951, Berry et al. (Infect Immun, 67:981-985 (1999)) e Patente Internacional 99/03884.

Como usado neste lugar, é entendido que o termo “Ply" se refere uma pneumolisina mutada ou destoxificada adequada para uso médico (i.e., não tóxica).

Em relação à família de Proteína de Ligação de Colina (CbpX), membros daquela família foram originalmente identificados como proteínas pneumocócicas que podem ser purificadas por cromatografia de afinidade por colina. Todas as proteínas de ligação de colina são não covalentemente ligadas a unidades de fosforilcolina de ácido teicóico de parede celular e ácido lipoteicóico associado à membrana. Estruturalmente, elas têm diversas regiões em comum na família inteira, embora a natureza exata das proteínas (seqüência de aminoácidos, comprimento, etc.) possa variar. Em geral, proteínas de ligação de colina compreendem uma região N terminal (N), regiões de repetição conservada (R1 e/ou R2), uma região rica em prolina (P) e uma região de ligação de colina conservada (C), constituída de repetições múltiplas, que compreende aproximadamente metade da proteína. Como usado neste pedido, o termo “família de Proteína de Ligação de Colina (CbpX)" é selecionado a partir do grupo consistindo de Proteínas de ligação de colina como identificado em Patente Internacional 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, e CbpG. CbpA é descrita em Patente

Internacional 97/41151. CbpD e CbpG são descritas em Patente Internacional 00/29434. PspC é descrita em Patente Internacional 97/09994. PbcA é descrita em Patente Internacional 98/21337. SpsA é uma proteína de ligação de Colina descrita em Patente Internacional 98/39450. Opcionalmente as Proteínas de Ligação de Colina são selecionadas a partir do grupo consistindo de CbpA, PbcA, SpsA e PspC.

Uma forma de realização da invenção compreende truncados de CbpX caracterizados pelo fato de que "CbpX" é definida acima e "truncados" se refere a proteínas CbpX carecendo de 50% ou mais da região de ligação de Colina (C). Opcionalmente tais proteínas carecem da região de ligação de colina inteira. Opcionalmente, os tais truncados protéicos carecem (i) da região de ligação de colina e (ii) de uma porção da metade N-terminal da proteína também, embora retendo pelo menos uma região de repetição (R1 ou R2). Opcionalmente, o truncado tem 2 regiões de repetição (R1 e R2). Exemplos de tais formas de realização são NR1xR2 e R1xR2 como ilustrado em Patente Internacional 99/51266 ou Patente Internacional 99/51188, entretanto, outras proteínas de ligação de colina carecendo de uma região de ligação de colina similar também são contempladas dentro do escopo desta invenção.

A família de LytX é de proteínas associadas à membrana associadas com lise celular. O domínio N-terminal compreende domínio(s) de ligação de colina, entretanto a família de LytX não tem todas as características encontradas na família de CbpA observadas acima e assim para a presente invenção, a família de LytX é considerada distinta da família de CbpX. Em contraste com a família de CbpX, o domínio C-terminal contém o domínio catalítico da família de proteína LytX. A família compreende LytA, B e C. Com respeito à família LytX, LytA é descrita em Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB é descrita em Patente Internacional 98/18930, e também é referida como Sp46. LytC também é descrita em Patente

Internacional 98/18930, e também é referida como Sp91. Uma forma de realização da invenção compreende LytC.

Outra forma de realização compreende truncados de LytX caracterizados pelo fato de que "LytX" é definida acima e "truncados" se refere a proteínas LytX carecendo de 50% ou mais da região de ligação de Colina. Opcionalmente tais proteínas carecem da região de ligação de colina inteira. Ainda outra forma de realização desta invenção compreende proteínas quiméricas truncadas de CbpX-truncada de LytX (ou fusões). Opcionalmente isto compreende NR1xR2 (ou R1xR2) de CbpX e a porção C-terminal (Cterm, i.e., carecendo dos domínios de ligação de colina) de LytX (e.g., LytCCterm ou Sp9lCterm). Opcionalmente CbpX é selecionada a partir do grupo consistindo de CbpA, PbcA, SpsA e PspC. Opcionalmente, ela é CbpA. Opcionalmente, LytX é LytC (também referida como Sp91). Outra forma de realização da presente invenção é um truncado de PspA ou PsaA carecendo do domínio de ligação de colina (C) e expresso como uma proteína de fusão com LytX. Opcionalmente, LytX é LytC.

Com respeito a PsaA e PspA, ambos são conhecidos na arte. Por exemplo, PsaA e variantes com deleção transmembrana desta foram descritas por Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62. PspA e variantes com deleção transmembrana desta foram descritas em, por exemplo, Patente Norte-Americana 5804193, Patente Internacional 92/14488, e Patente Internacional 99/53940.

Sp128 e Sp130 são descritas em Patente Internacional 00/76540. Sp125 é um exemplo de uma proteína de superfície pneumocócica com o motivo Ancorado em Parede Celular de LPXTG (onde X é qualquer aminoácido). Qualquer proteína dentro desta classe de proteína de superfície pneumocócica com este motivo foi encontrada ser útil dentro do contexto desta invenção, e portanto é considerada uma proteína adicional da invenção. A própria Sp125 é descrita em Patente Internacional 98/18930, e também é

conhecida como ZmpB – uma metaloproteinase de zinco. Sp101 é descrita em Patente Internacional 98/06734 (onde ela tem a referência # y85993). Ela é caracterizada por uma seqüência sinal tipo I. Sp133 é descrita em Patente Internacional 98/06734 (onde ela tem a referência # y85992). Ela também é caracterizada por uma seqüência sinal tipo I.

Exemplos de antígenos protéicos preferidos de Moraxella catarrhalis que podem ser incluídos em uma vacina de combinação (especialmente para a prevenção de otite média) são: OMP106 [Patente Internacional 97/41731 (Antex) & Patente Internacional 96/34960 (PMC)]; OMP21 ou fragmentos destes (Patente Internacional 0018910); LbpA &/ou LbpB [Patente Internacional 98/55606 (PMC)]; TbpA &/ou TbpB [Patente Internacional 97/13785 & Patente Internacional 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et a/. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 e/ou UspA2 [Patente Internacional 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); Pilo (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipoll (GB 9918302.2); lipol8 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmplA1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); e OmpE. Exemplos de antígenos de Haemophilus influenzae não tipáveis ou fragmentos destes que podem ser incluídos em uma vacina de combinação (especialmente para a prevenção de otite média) incluem: Proteína Fimbrina [(Patente Norte-Americana 5766608 - Ohio State Research Foundation)] e fusões compreendendo peptídeos desta [eg fusões de peptídeo LB1(f); Patente Norte-Americana 5843464 (OSU) ou Patente Internacional 99/64067]; OMP26 [Patente Internacional 97/01638 (Cortecs)]; P6 [Patente Européia 281673 (State University of New York)]; TbpA e/ou TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmwl ; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (Patente Internacional 94/12641); P2; e P5 (Patente Internacional 94/26304).

As proteínas da invenção também podem ser beneficamente

combinadas. Por combinadas é pretendido que a composição imunogênica compreende todas as proteínas de dentro das seguintes combinações, ou como proteínas carreadoras ou como proteínas livres ou uma mistura das duas. Por exemplo, em uma combinação de duas proteínas como especificado a seguir, ambas as proteínas podem ser usadas como proteínas carreadoras, ou ambas as proteínas podem estar presentes como proteínas livres, ou ambas podem estar presentes como carreador e como proteína livre, ou uma pode estar presente como uma proteína carreadora e uma proteína livre enquanto que a outra está presente apenas como uma proteína carreadora ou apenas como uma proteína livre, ou uma pode estar presente como uma proteína carreadora e a outra como uma proteína livre. Onde uma combinação de três proteínas é dada, existem possibilidades similares. Combinações incluem, mas não são limitadas a, PhtD + NR1xR2, proteínas de fusão ou quiméricas PhtD + NR1xR2-Sp9lCterm, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + proteínas de fusão ou quiméricas NR1xR2-Sp9lCterm, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Opcionalmente, NR1xR2 (ou R1xR2) é de CbpA ou PspC. Opcionalmente ele é de CbpA. Outras combinações incluem 3 combinações de proteínas tal como PhtD + NR1xR2 + Ply, e PhtA + NR1xR2 + PhtD. Em uma forma de realização, a composição de vacina compreende pneumolisina destoxificada e PhtD ou PhtDE como proteínas carreadoras. Em uma forma de realização adicional, a composição de vacina compreende pneumolisina destoxificada e PhtD ou PhtDE como proteínas livres.

Em um aspecto independente, a presente invenção fornece uma composição imunogênica compreendendo pelo menos quatro conjugados de sacarídeo capsular de S. pneumoniae contendo sacarídeos de diferentes sorotipos de S. pneumoniae caracterizados pelo fato de que pelo menos um

sacarídeo é conjugado a PhtD ou proteína de fusão desta e a composição imunogênica é capaz de obter uma resposta imune eficaz contra PhtD.

Uma resposta imune eficaz contra PhtD ou proteína de fusão desta é medida por exemplo por um ensaio de proteção tal como aquele descrito em exemplo 15. Uma resposta imune eficaz fornece pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% de sobrevivência 7 dias depois de desafio com uma linhagem heteróloga. Dado que a linhagem de desafio é heteróloga, a proteção proporcionada é devido à resposta imune contra PhtD ou proteína de fusão desta.

Alternativamente, uma resposta imune eficaz contra PhtD é medida por ELISA como descrito em exemplo 14. Uma resposta imune eficaz gera uma resposta de IgG anti-PhtD de pelo menos 250, 300, 350, 400, 500, 550 ou 600 μg/mI de GMC.

Por exemplo, a composição imunogênica compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 sacarídeos capsulares de S. pneumoniae de sorotipos diferentes conjugados a PhtD ou proteína de fusão desta. Por exemplo sorotipos 22F e 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 selecionados adicionalmente a partir de sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 23F e 33F são conjugados a PhtD. Em uma forma de realização dois ou três dos sorotipos 3, 6A e 22F são conjugados a PhtD ou proteína de fusão desta.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende pelo menos um sacarídeo capsular de S. pneumoniae conjugado a PhtD ou proteína de fusão desta através de um ligante, por exemplo ADH. Em uma forma de realização, uma das químicas de conjugação listadas abaixo é usada.

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende pelo menos um sacarídeo capsular de S. pneumoniae conjugado a PhtD ou proteína de fusão desta, caracterizado pelo fato de que a

proporção de PhtD para sacarídeo no conjugado é entre 6:1 e 1:5, 6:1 e 2:1, 6:1 e 2,5:1, 6:1 e 3:1, 6:1 e 3,5:1 (p/p) ou é maior do que (i.e. contém uma maior proporção de PhtD) 2,0:1, 2,5:1, 3,0:1, 3,5:1 ou 4,0:1 (p/p).

Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende pneumolisina.

A presente invenção fornece adicionalmente uma vacina contendo as composições imunogênicas da invenção e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

As vacinas da presente invenção podem ser adjuvantadas, particularmente quando pretendidas para uso em uma população idosa mas também para uso em populações bebês. Adjuvantes adequados incluem um sal de alumínio tal como gel de hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio ou alume, mas também podem ser outros sais metálicos tal como aqueles de cálcio, magnésio, ferro ou zinco, ou podem ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada, ou açúcares acilados, sacarídeos cationicamente ou anionicamente derivados, ou polifosfazenos.

O adjuvante é opcionalmente selecionado para ser um indutor preferencial de um tipo TH1 de resposta. Tais altos níveis de citocinas tipo Th1 tendem a favorecer a indução de respostas imunes mediadas por células para um dado antígeno, enquanto que altos níveis de citocinas tipo Th2 tendem a favorecer a indução de respostas imunes humorais para o antígeno.

A distinção de resposta imune tipo Th1 e Th2 não é absoluta. Em realidade um indivíduo irá suportar uma resposta imune que é descrita como sendo predominantemente Th1 ou predominantemente Th2. Entretanto, freqüentemente é conveniente considerar as famílias de citocinas em termos daquelas descritas em clones de CD4 +ve célula T murinos por Mosmann e Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173)). Tradicionalmente,

respostas tipo Th1 estão associadas com a produção das citocinas INF-y e IL-2 por linfócitos T. Outras citocinas freqüentemente diretamente associadas com a indução de respostas imunes tipo Th1 não são produzidas por células T, tal como IL-12. Em contraste, respostas tipo Th2 estão associadas com a secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Sistemas adjuvantes adequados que promovem uma resposta predominantemente Th1 incluem: Monofosforil lipídio A ou um derivado deste (ou lipídio A destoxificado em geral – veja por exemplo Patente Internacional 2005107798), particularmente monofosforil lipídio A 3-0-Desacilado (3D-MPL) (para sua preparação veja GB 2220211 A); e uma combinação de monofosforil lipídio A, opcionalmente monofosforil lipídio A 3-0-Desacilado, junto ou com um sal de alumínio (por exemplo fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio) ou uma emulsão de óleo em água. Em tais combinações, antígeno e 3D-MPL são contidos nas mesmas estruturas particuladas, permitindo liberação mais eficiente de sinais antigênicos e imunoestimuladores. Estudos mostraram que 3D-MPL é capaz de estimular adicionalmente a imunogenicidade de um antígeno adsorvido a alume [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:708-14; Patente Européia 689454-B1].

Um sistema reforçado envolve a combinação de um monofosforil lipídio A e um derivado de saponina, particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL como descrito em Patente Internacional 94/00153, ou uma composição menos reatogênica onde a QS21 é suprimida com colesterol como descrito em Patente Internacional 96/33739. Uma formulação de adjuvante particularmente potente envolvendo QS21, 3D-MPL e tocoferol em uma emulsão de óleo em água é descrita em Patente Internacional 95/17210. Em uma forma de realização a composição imunogênica adicionalmente compreende uma saponina, que pode ser QS21. A formulação também pode compreender uma emulsão de óleo em água e tocoferol (Patente Internacional 95/17210). CpG não metilada contendo

oligonucleotídeos (Patente Internacional 96/02555) e outros oligonucleotídeos imunomoduladores (Patente Internacional 0226757 e Patente Internacional 03507822) também são indutores preferenciais de uma resposta de Th1 e são adequados para uso na presente invenção.

Adjuvantes particulares são aqueles selecionados a partir do grupo de Sais metálicos, emulsões de óleo em água, agonista de receptores tipo Toll, (em particular agonista de receptor 2 tipo Toll, agonista de receptor 3 tipo Toll, agonista de receptor 4 tipo Toll, agonista de receptor 7 tipo Toll, agonista de receptor 8 tipo Toll e agonista de receptor 9 tipo Toll), saponinas ou combinações destes.

Um adjuvante que pode ser usado com as composições de vacina da invenção são preparações de pústula ou vesícula de membrana externa de linhagens bacterianas Gram negativas tal como aquelas pensadas por Patente Internacional 02/09746 - particularmente pústulas de N. meningitidis. Propriedades adjuvantes de pústulas podem ser melhoradas retendo LOS (lipooligossacarídeo) em sua superfície (e.g. através de extração com baixas concentrações de detergente [por instante 0-0,1% de desoxicolato]). LOS pode ser destoxificado através das mutações msbB(-) ou htrB(-) discutidas em Patente Internacional 02/09746. Propriedades adjuvantes também podem ser melhoradas retendo PorB (e opcionalmente removendo PorA) de pústulas meningocócicas. Propriedades adjuvantes também podem ser melhoradas truncando a estrutura de sacarídeo de núcleo exterior de LOS em pústulas meningocócicas - por exemplo através da mutação IgtB(-) discutida em Patente Internacional 2004/014417. Alternativamente, o LOS mencionado acima (e.g. isolado de uma linhagem msbB(-) e/ou IgtB(-)) pode ser purificado e usado como um adjuvante nas composições da invenção.

Um adjuvante adicional que pode ser usado com as composições da invenção pode ser selecionado a partir do grupo: uma

saponina, lipídio A ou um derivado deste, um oligonucleotídeo imunoestimulador, um alquil glucosaminida fosfato, uma emulsão de óleo em água ou combinações destes. Um adjuvante adicional que pode ser usado com as composições da invenção é um sal metálico em combinação com outro adjuvante. Em uma forma de realização, o adjuvante é um agonista de receptor tipo Toll em particular um agonista de receptor tipo Toll 2, 3, 4, 7, 8 ou 9, ou uma saponina, em particular Qs21. Em uma forma de realização, o sistema adjuvante compreende dois ou mais adjuvantes da lista acima. Em particular as combinações opcionalmente contêm um adjuvante de saponina (em particular Qs21) e/ou um agonista de receptor 9 tipo Toll tal como um CpG contendo oligonucleotídeo imunoestimulador. Outras combinações compreendem uma saponina (em particular QS21) e um agonista de receptor 4 tipo Toll tal como monofosforil lipídio A ou seu derivado 3 desacilado, 3 D - MPL, ou uma saponina (em particular QS21) e um ligante de receptor 4 tipo Toll tal como um alquil glucosaminida fosfato.

Em uma forma de realização, adjuvantes são combinações de 3D-MPL e QS21 (Patente Européia 0 671 948 B1), emulsões de óleo em água compreendendo 3D-MPL e QS21 (Patente Internacional 95/17210, Patente Internacional 98/56414), ou 3D-MPL formulado com outros carreadores (Patente Européia 0 689 454 B1). Em uma forma de realização, sistemas adjuvantes compreendem uma combinação de 3 D MPL , QS21 e um oligonucleotídeo CpG como descrito em Patente Norte-Americana 6558670, Patente Norte-Americana 6544518.

Em uma forma de realização o adjuvante é um ligante de receptor tipo Toll (TLR) 4, opcionalmente uma agonista tal como um derivado de lipídio A particularmente monofosforil lipídio A ou mais particularmente monofosforil lipídio A 3 Desacilado (3 D – MPL).

3 D-MPL está disponível a partir de GlaxoSmithKline Biologicals North America e primariamente promove respostas de CD4+

célula T com um fenótipo IFN-g (TM). Ele pode ser produzido de acordo com os métodos descritos em GB 2 220 211 A. Quimicamente ele é uma mistura de monofosforil lipídio A 3- desacilado com 3, 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Em uma forma de realização, nas composições da presente invenção 3 D- MPL de partícula pequena é usado. 3 D -MPL de partícula pequena tem um tamanho de partícula de forma que ela pode ser filtrada de forma estéril através de um filtro de 0,22μm. Tais preparações são descritas em Pedido de Patente Internacional No. 94/21292. Derivados sintéticos de lipídio A são conhecidos e pensados ser agonistas de TLR 4 incluindo, mas não limitado a:

0M174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetra-decanoilamino]-4-o-fosfono-13-D-glucopiranosil1-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-a-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (Patente Internacional 95/14026)

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-dio1,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (Patente Internacional 99/64301 e Patente Internacional 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-dio1,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (Patente Internacional 01/46127)

Outros ligantes de TLR4 que podem ser usados são alquil glucosaminida fosfatos (AGPs) tal como aqueles descritos em Patente Internacional 9850399 ou Patente Norte-Americana 6303347 (processos para preparação de AGPs também são descritos), ou sais farmaceuticamente aceitáveis de AGPs como descrito em Patente Norte-Americana 6764840. Alguns AGPs são agonistas de TLR4, e alguns são antagonistas de TLR4. Acredita-se que ambos sejam úteis como adjuvantes.

Outro imunoestimulante para uso na presente invenção é Quil

A e seus derivados. Quil A é uma preparação de saponina isolada da árvore Sul-Americana Quilaja saponaria Molina e foi primeiro descrita como tendo atividade adjuvante por Dalsgaard et al. em 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254). Fragmentos purificados de Quil A foram isolados por HPLC que retém atividade adjuvante sem a toxicidade associada com Quil A (Patente Européia 0 362 278), por exemplo QS7 e QS21 (também conhecidas como QA7 e QA21). QS-21 é uma saponina natural derivada da cortiça de Quillaja saponaria Molina que induz CD8+ células T citotóxicas (CTLs), células Th1 e uma resposta predominante de anticorpo lgG2a e é uma saponina no contexto da presente invenção.

Foram descritas formulações particulares de QS21 que são uma forma de realização da invenção, estas formulações compreendem adicionalmente um esterol (Patente Internacional 96/33739). As saponinas formando parte da presente invenção podem ser separadas na forma de micelas, micelas misturadas (opcionalmente com sais biliares) ou podem estar na forma de matrizes ISCOM (Patente Européia 0 109 942 B1) , lipossomos ou estruturas coloidais relacionadas tal como complexos multiméricos tubulares ou cilíndricos ou estruturas lipídicas/em camadas e lamelas quando formuladas com colesterol e lipídio, ou na forma de uma emulsão de óleo em água (por exemplo como em Patente Internacional 95/17210). As saponinas podem estar associadas com um sal metálico, tal como hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio (Patente Internacional 98/15287).

Opcionalmente, a saponina é apresentada na forma de um lipossomo, ISCOM ou uma emulsão de óleo em água.

Um sistema reforçado envolve a combinação de um monofosforil lipídio A (ou lipídio A destoxificado) e um derivado de saponina, particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL como descrito em Patente Internacional 94/00153, ou uma composição menos reatogênica

onde a QS21 é suprimida com colesterol como descrito em Patente Internacional 96/33739. Uma formulação de adjuvante particularmente potente envolvendo tocoferol com ou sem QS21 e/ou 3D-MPL em uma emulsão de óleo em água é descrita em Patente Internacional 95/17210.

Em uma forma de realização a composição imunogênica compreende adicionalmente uma saponina, que pode ser QS21.

Oligonucleotídeos imunoestimuladores ou qualquer outro agonista de receptor tipo Toll (TLR) 9 também podem ser usados.Os oligonucleotídeos para uso em adjuvantes ou vacinas da presente invenção são opcionalmente CpG contendo oligonucleotídeos, opcionalmente contendo dois ou mais motivos de dinucleotídeos CpG separados por pelo menos três, opcionalmente pelo menos seis ou mais nucleotídeos. Um motivo CpG é um nucleotídeo Citosina seguido por um nucleotídeo Guanina. Os oligonucleotídeos CpG da presente invenção tipicamente são desoxinucleotídeos. Em uma forma de realização o internucleotídeo no oligonucleotídeo é fosforoditioato, ou uma ligação de fosforotioato, embora ligações de fosfodiéster e outro internucleotídeo estejam dentro do escopo da invenção. Também incluídos dentro do escopo da invenção são oligonucleotídeos com ligações misturadas de internucleotídeo. Métodos para produzir oligonucleotídeos de fosforotioato ou fosforoditioato são descritos em Patente Norte-Americana 5.666.153, Patente Norte-Americana 5.278.302 e Patente Internacional 95/26204.

Exemplos de oligonucleotídeos têm as seguintes seqüências. As seqüências opcionalmente contêm ligações entre nucleotídeos modificadas com fosforotioato.

OLIGO 1(SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3(SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC

ACG OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

OLIGO 6 (SEQ ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

Oligonucleotídeos CpG alternativos podem compreender as seqüências preferidas acima já que eles têm deleções ou adições sem conseqüências para estes.

Os oligonucleotídeos CpG utilizados na presente invenção podem ser sintetizados por qualquer método conhecido na arte (por exemplo veja Patente Européia 468520). Convenientemente, tais oligonucleotídeos podem ser sintetizados utilizando um sintetizador automatizado.

O adjuvante pode ser uma emulsão de óleo em água ou pode compreender uma emulsão de óleo em água em combinação com outros adjuvantes. A fase oleosa do sistema de emulsão opcionalmente compreende um óleo metabolizável. O significado do termo óleo metabolizável é bem conhecido na arte. Metabolizável pode ser definido como "sendo capaz de ser transformado por metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edição (1974)). O óleo pode ser qualquer óleo vegetal, peixe, óleo, óleo animal ou sintético, que não é tóxico ao destinatário e é capaz de ser transformado por metabolismo. Nozes, sementes, e grãos são fontes comuns de óleos vegetais. Óleos sintéticos também são parte desta invenção e podem incluir óleos comercialmente disponíveis tal como NEOBEE® e outros. Esqualeno (2,6,10,15,19, 23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) é um óleo insaturado que é encontrado em grandes quantidades em óleo de fígado de tubarão, e em quantidades inferiores em

óleo de oliva, óleo de gérmen de trigo, óleo de farelo de arroz, e levedura, e é um óleo para uso nesta invenção. Esqualeno é um óleo metabolizável devido ao fato de que ele é um intermediário na biossíntese de colesterol (Merck index, 10ª Edição, entry no.8619).

Tocóis (e.g. vitamina E) também são freqüentemente usados em adjuvantes de emulsões oleosas (Patente Européia 0 382 271 B1; Patente Norte-Americana 5667784; Patente Internacional 95/17210). Tocóis usados nas emulsões oleosas (opcionalmente emulsões de óleo em água) da invenção podem ser formulados como descrito em Patente Européia 0 382 271 B1, já que os tocóis podem ser dispersões de gotas de tocol, opcionalmente compreendendo um emulsificante, de opcionalmente menos do que 1 mícron em diâmetro. Alternativamente, os tocóis podem ser usados em combinação com outro óleo, para formar a fase oleosa de uma emulsão. Exemplos de emulsões oleosas que podem ser usadas em combinação com o tocol são descritos neste lugar, tal como os óleos metabolizáveis descritos acima.

Adjuvantes de emulsão de óleo em água por si foram sugeridos como sendo úteis como composições adjuvantes (Patente Européia 0 399 843B), também combinações de emulsões de óleo em água e outros agentes ativos foram descritos como adjuvantes para vacinas (Patente Internacional 95/17210; Patente Internacional 98/56414; Patente Internacional 99/12565; Patente Internacional 99/11241). Outros adjuvantes de emulsão oleosa foram descritos, tal como emulsões de água em óleo (Patente Norte-Americana 5.422.109; Patente Européia 0 480 982 B2) e água em emulsões de óleo em água (Patente Norte-Americana 5.424.067; Patente Européia 0 480 981 B). Todos os quais formam sistemas de emulsão oleosa (em particular quando incorporando tocóis) para formar adjuvantes e composições da presente invenção.

Em uma forma de realização, a emulsão oleosa (por exemplo emulsões de óleo em água) compreende adicionalmente um emulsificante tal

como TWEEN 80 e/ou um esterol tal como colesterol.

Em uma forma de realização, a emulsão oleosa (opcionalmente emulsão de óleo em água) compreende um óleo metabolizável não tóxico, tal como esqualano, esqualeno ou um tocoferol tal como alfa tocoferol (e opcionalmente tanto esqualeno como alfa tocoferol) e opcionalmente um emulsificante (ou tensoativo) tal como Tween 80. Um esterol (e.g. colesterol) também pode estar incluído.

O método de produzir emulsões de óleo em água é bem conhecido pelo homem versado na arte. Comumente, o método compreende misturar a fase oleosa contendo tocol com um tensoativo tal como uma solução de PBS/TWEEN80^{Tm}, seguido por homogeneização usando um homogeneizador, seria claro para um homem versado na arte que um método compreendendo passar a mistura das vezes através de uma agulha de seringa seria adequado para homogeneizar pequenos volumes de líquido. Igualmente, o processo de emulsificação em microfluidizador (M110S Máquina de microfluídica, máximo de 50 passagens, por um período de 2 minutos em força de pressão máxima de 6 bar (pressão de saída de cerca de 850 bar)) pode ser adaptada pelo homem versado na arte para produzir volumes menores ou maiores de emulsão. A adaptação pode ser atingida por experimentação de rotina compreendendo a mensuração da emulsão resultante até que uma preparação fosse atingida com gotas de óleo do diâmetro requerido.

Em uma emulsão de óleo em água, o óleo e emulsificante devem estar em um carreador aquoso. O carreador aquoso pode ser, por exemplo, salina tamponada com fosfato.

O tamanho das gotas de óleo encontradas dentro da emulsão estável de óleo em água opcionalmente é menor do que 1 mícron, pode ser no intervalo de substancialmente 30-600nm, opcionalmente substancialmente cerca de 30-500nm em diâmetro, e opcionalmente substancialmente 150-500nm em diâmetro, e em particular cerca de 150 nm em diâmetro se medido

por espectroscopia de correlação de fótons. Neste contexto, 80% das gotas de óleo em número devem estar dentro dos intervalos, opcionalmente mais do que 90% e opcionalmente mais do que 95% das gotas de óleo em número estão dentro dos intervalos de tamanho definidos. As quantidades dos componentes presentes nas emulsões oleosas da presente invenção são convencionalmente no intervalo de a partir de 0,5-20% ou 2 a 10% de óleo (do volume de dose total), tal como esqualeno; e quando presente, de 2 a 10% de alfa tocoferol; e de 0,3 a 3% de tensoativo, tal como monooleato de polioxietileno sorbitano. Opcionalmente a proporção de óleo (e.g. esqualeno): tocol (e.g. α-tocoferol) é igual ou menor do que 1 pois esta fornece uma emulsão mais estável. Um emulsificante, tal como Tween80 ou Span 85 também pode estar presente em um nível de cerca de 1%. Em alguns casos pode ser vantajoso que as vacinas da presente invenção contenham adicionalmente um estabilizante.

Exemplos de sistemas de emulsão são descritos em Patente Internacional 95/17210, Patente Internacional 99/11241 e Patente Internacional 99/12565 as quais descrevem adjuvantes de emulsão baseados em esqualeno, α-tocoferol, e TWEEN 80, opcionalmente formulados com os imunoestimulantes QS21 e/ou 3D-MPL.

Assim em uma forma de realização da presente invenção, o adjuvante da invenção pode compreender adicionalmente imunoestimulantes adicionais, tal como LPS ou derivados deste, e/ou saponinas. Exemplos de imunoestimulantes adicionais são descritos neste lugar e em "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, MI., and Newman, M.J., Plenum Press, Nova Iorque e Londres, ISBN 0-306-44867-X.

Em uma forma de realização, o adjuvante e composições imunogênicas de acordo com a invenção compreendem uma saponina (e.g. QS21) e/ou um derivado de LPS (e.g. 3D-MPL) em uma emulsão oleosa

descrita acima, opcionalmente com um esterol (e.g. colesterol). Adicionalmente a emulsão oleosa (opcionalmente emulsão de óleo em água) pode conter span 85 e/ou lecitina e/ou tricaprilina. Adjuvantes compreendendo uma emulsão de óleo em água, um esterol e uma saponina são descritos em Patente Internacional 99/12565.

Tipicamente para administração humana a saponina (e.g. QS21) e/ou derivado de LPS (e.g. 3D-MPL) estará presente em uma dose humana de composição imunogênica no intervalo de 1μg – 200μg, tal como 10-100μg, ou 10μg - 50μg por dose. Tipicamente a emulsão oleosa (opcionalmente emulsão de óleo em água) irá compreender de 2 a 10% de óleo metabolizável. Opcionalmente ela irá compreender de 2 a 10% de esqualeno, de 2 a 10% de alfa tocoferol e de 0,3 a 3% (opcionalmente 0,4 – 2%) de emulsificante (opcionalmente tween 80 [monooleato de polioxietileno sorbitano]). Onde tanto esqualeno como alfa tocoferol estão presentes, opcionalmente a proporção de esqualeno: alfa tocoferol é igual a ou menor do que 1 pois esta fornece uma emulsão mais estável. Span 85 (Trioleato de sorbitano) também pode estar presente em um nível de 0,5 a 1% nas emulsões usadas na invenção. Em alguns casos pode ser vantajoso que as composições imunogênicas e vacinas da presente invenção contenham adicionalmente um estabilizante, por exemplo outros emulsificantes/tensoativos, incluindo ácido caprílico (índice merck 10ª Edição, entrada no. 1739), por exemplo Tricaprilina.

Onde esqualeno e uma saponina (opcionalmente QS21) estão incluídos, é benéfico também incluir um esterol (opcionalmente colesterol) à formulação pois isto permite uma redução no nível total de óleo na emulsão. Isto leva a um custo reduzido de fabricação, melhora do conforto geral da vacinação, e também melhoras qualitativas e quantitativas das respostas imunes resultantes, tal como produção melhorada de IFN-y. Por conseguinte, o sistema adjuvante da presente invenção tipicamente compreende uma

proporção de óleo metabolizável:saponina (p/p) no intervalo de 200:1 a 300:1, a presente invenção também pode ser usada em uma forma com "pouco óleo" o intervalo preferido do qual é 1:1 a 200:1, opcionalmente 20:1 a 100:1, ou substancialmente 48:1, esta vacina retém as propriedades adjuvantes benéficas de todos os componentes, com um perfil de reatogenicidade muito reduzido. Por conseguinte, algumas formas de realização têm uma proporção de esqualeno:QS21 (p/p) no intervalo de 1:1 a 250:1, ou 20:1 a 200:1, ou 20:1 a 100:1, ou substancialmente 48:1. Opcionalmente um esterol (e.g. colesterol) também é incluído presente em uma proporção de saponina:esterol como descrito neste lugar.

Os sistemas de emulsão da presente invenção opcionalmente têm um tamanho pequeno de gota de óleo no intervalo de sub-mícron. Opcionalmente os tamanhos de gota de óleo estarão no intervalo 120 a 750 nm, ou de 120-600nm em diâmetro.

Uma formulação adjuvante particularmente potente (para combinação instantânea com AIPO4 nas composições imunogênicas da invenção) envolve uma saponina (e.g. QS21), um derivado de LPS (e.g. 3D-MPL) e uma emulsão oleosa (e.g. esqualeno e alfa tocoferol em uma emulsão de óleo em água) como descrito em Patente Internacional 95/17210 ou em Patente Internacional 99/12565 (em particular formulação adjuvante 11 em exemplo 2, Tabela 1).

Exemplos de um agonista de TLR 2 incluem peptidoglicana ou lipoproteína. Imidazoquinolinas, tal como Imiquimode e Resiquimode são agonistas de TLR7 conhecidos. RNA de fita simples também é um agonista de TLR conhecido (TLR8 em humanos e TLR7 em camundongos), ao passo que RNA dupla fita e poli IC (ácido poliinosínico-policitidílico – um mimético sintético comercial de RNA viral). são exemplares de agonistas de TLR 3. 3D-MPL é um exemplo de um agonista de TLR4 enquanto que CPG é um exemplo de um agonista de TLR9.

A composição imunogênica pode compreender um antígeno e um imunoestimulante adsorvido em um sal metálico. Formulações de vacina baseadas em alumínio caracterizadas pelo fato de que o antígeno e o imunoestimulante monofosforil lipídio A 3-desacilado (3D-MPL), são adsorvidos na mesma partícula são descritos em Patente Européia 0 576 478 B1, Patente Européia 0 689 454 B1, e Patente Européia 0 633 784 B1. Nestes casos então antígeno é primeiro adsorvido no sal de alumínio seguido pela adsorção do imunoestimulante 3D-MPL nas mesmas partículas de sal de alumínio. Tais processos primeiro envolvem a suspensão de 3D-MPL por sonicação em um banho-maria até que as partículas atinjam um tamanho de entre 80 e 500 nm. O antígeno tipicamente é adsorvido em sal de alumínio por uma hora em temperatura ambiente sob agitação. A suspensão de 3DMPL é então adicionada ao antígeno adsorvido e a formulação é incubada em temperatura ambiente por 1 hora, e então mantida a 4oC até uso.

Em outro processo, o imunoestimulante e o antígeno estão em partículas metálicas separadas, como descrito em Patente Européia 1126876. O processo melhorado compreende a adsorção de imunoestimulante, em uma partícula de sal metálico, seguido pela adsorção do antígeno em outra partícula de sal metálico, seguido pela mistura das partículas metálicas discretas para formar uma vacina. O adjuvante para uso na presente invenção pode ser uma composição adjuvante compreendendo um imunoestimulante, adsorvido em uma partícula de sal metálico, caracterizado pelo fato de que partícula de sal metálico é substancialmente livre de outro antígeno. Além disso, vacinas são fornecidas pela presente invenção e são caracterizadas pelo fato de que o imunoestimulante é adsorvido em partículas de sal metálico que são substancialmente livres de outro antígeno, e pelo fato de que as partículas de sal metálico que estão adsorvidas ao antígeno são substancialmente livres de outro imunoestimulante.

Por conseguinte, a presente invenção fornece uma formulação

adjuvante compreendendo imunoestimulante que foi adsorvido em uma partícula de um sal metálico, caracterizada pelo fato de que a composição é substancialmente livre de outro antígeno. Além disso, esta formulação adjuvante pode ser um intermediário que, se um tal adjuvante é usado, é requerido para a fabricação de uma vacina. Por conseguinte é fornecido um processo para a fabricação de uma vacina compreendendo misturar uma composição adjuvante que é um ou mais imunoestimulantes adsorvidos em uma partícula metálica com um antígeno. Opcionalmente, o antígeno foi pré-adsorvido em um sal metálico. Dito sal metálico pode ser idêntico ou similar ao sal metálico que é adsorvido no imunoestimulante. Opcionalmente o sal metálico é um sal de alumínio, por exemplo Fosfato de alumínio ou Hidróxido de alumínio.

A presente invenção sustenta adicionalmente uma composição de vacina compreendendo imunoestimulante adsorvido em uma primeira partícula de um sal metálico, e antígeno adsorvido em um sal metálico, caracterizada pelo fato de que primeira e segunda partícula de sal metálico são partículas separadas.

Derivados ou mutações de LPS ou LOS ou derivado de lipídio A descritos neste lugar são construídos para serem menos tóxicos (e.g. 3D-MPL) do que lipossacarídeos nativos e são equivalentes permutáveis com respeito a quaisquer usos destas unidades descritos neste lugar.

Em uma forma de realização o adjuvante usado para as composições da invenção compreende um carreador lipossômico (feito por técnicas conhecidas a partir de uns fosfolipídios (tal como dioleoil fosfatidil colina [DOPC]) e opcionalmente um esterol [tal como colesterol]). Tais carreadores lipossômicos podem carregar derivados de lipídio A [tal como 3D-MPL – veja acima] e/ou saponinas (tal como QS21 – veja acima). Em uma forma de realização o adjuvante compreende (por dose de 0,5 mL) 0,1-10mg, 0,2-7, 0,3-5, 0,4-2, ou 0,5-1 mg (e.g. 0,4-0,6, 0,9-1,1, 0,5 ou 1 mg) de

fosfolipídio (por exemplo DOPC), 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, ou 0,125-0,25 mg (e.g. 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 ou 0,125 mg) de esterol (por exemplo colesterol), 5-60, 10-50, ou 20-30 μg (e.g. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ou 50 μg) de derivado de lipídio A (por exemplo 3DMPL), e 5-60, 10-50, ou 20-30 14 (e.g. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ou 50 μg) de saponina (por exemplo QS21).

Este adjuvante é particularmente adequado para formulações de vacina para idosos. Em uma forma de realização a composição de vacina compreendendo este adjuvante compreende conjugados de sacarídeos derivados de pelo menos todos os seguintes sorotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (e também pode compreender um ou mais de sorotipos 3, 6A, 19A, e 22F), caracterizada pelo fato de que o título de anticorpo GMC induzidos contra um ou mais dos (ou todos) componentes de vacina 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F não é significantemente inferior àquele induzido pela vacina Prevnar® em vacinas humanas.

Em uma forma de realização o adjuvante usado para as composições da invenção compreende uma emulsão de óleo em água feita a partir de um óleo metabolizável (tal como esqualeno), um emulsificante (tal como Tween 80) e opcionalmente um tocol (tal como alfa tocoferol). Em uma forma de realização o adjuvante compreende (por dose de 0,5 mL) 0,5-15, 1-13, 2-11, 4-8, ou 5-6mg (e.g. 2-3, 5-6, ou 10-11 mg) de óleo metabolizável (tal como esqualeno), 0,1-10, 0,3-8, 0,6-6, 0,9-5, 1-4, ou 2-3 mg (e.g. 0,9-1,1, 2-3 ou 4-5 mg) de emulsificante (tal como Tween 80) e opcionalmente 0,5-20, 1-15, 2-12, 4-10, 5-7 mg (e.g. 11-13, 5-6, ou 2-3 mg) de tocol (tal como alfa tocoferol).

Este adjuvante pode opcionalmente compreender adicionalmente 5-60, 10-50, ou 20-30 μg (e.g. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ou 50 μg) de derivado de lipídio A (por exemplo 3D-MPL).

Estes adjuvantes são particularmente adequados para

formulações de vacina para bebês ou idosos. Em uma forma de realização a composição de vacina compreendendo este adjuvante compreende conjugados de sacarídeos derivados de pelo menos todos os seguintes sorotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (e também pode compreender um ou mais de sorotipos 3, 6A, 19A, e 22F), caracterizada pelo fato de que o título de anticorpo GMC induzido contra um ou mais dos (ou todos) componentes de vacina 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F não é significantemente inferior àquele induzido pela vacina Prevnar® em vacinas humanas.

Este adjuvante pode conter opcionalmente 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, ou 0,1250,25 mg (e.g. 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 ou 0,125 mg) de esterol (por exemplo colesterol), 5-60, 10-50, ou 20-30 μg (e.g. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ou 50 μg) de derivado de lipídio A (por exemplo 3D-MPL), e 5-60, 10-50, ou 20-30 μg (e.g. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ou 50 μg) de saponina (por exemplo QS21).

Este adjuvante é particularmente adequado para formulações de vacina para idosos. Em uma forma de realização a composição de vacina compreendendo este adjuvante compreende conjugados de sacarídeos 34 derivados de pelo menos todos os seguintes sorotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (e também pode compreender um ou mais de sorotipos 3, 6A, 19A, e 22F), caracterizada pelo fato de que o título de anticorpo GMC induzido contra um ou mais dos (ou todos) componentes de vacina 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F não é significantemente inferior àquele induzido pela vacina Prevnar® em vacinas humanas.

Em uma forma de realização o adjuvante usado para as composições da invenção compreende fosfato de alumínio e um derivado de lipídio A (tal como 3D-MPL). Este adjuvante pode compreender (por dose de 0,5 mL) 100-750, 200-500, ou 300-400 μg de Al como fosfato de alumínio, e 5-60, 10-50, ou 20-30 μg (e.g. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ou 50 μg) de derivado de lipídio A (por exemplo 3D-MPL).

Este adjuvante é particularmente adequado para formulações de vacina para idosos ou bebês. Em uma forma de realização a composição de vacina compreendendo este adjuvante compreende conjugados de sacarídeos derivados de pelo menos todos os seguintes sorotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (e também pode compreender um ou mais de sorotipos 3, 6A, 19A, e 22F), caracterizada pelo fato de que o título de anticorpo GMC induzido contra um ou mais dos (ou todos) componentes de vacina 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F não é significantemente inferior àquele induzido pela vacina Prevnar® em vacinas humanas.

As preparações de vacina contendo composições imunogênicas da presente invenção podem ser usadas para proteger ou tratar um mamífero susceptível a uma infecção, por meio de administração de dita vacina através de via sistêmica ou mucosal. Estas administrações podem incluir injeção através das vias intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea; ou através de administração mucosal aos tratos oral/alimentar, respiratório, geniturinário. Administração intranasal de vacinas para o tratamento de pneumonia ou otite média é preferida (pois transporte nasofaríngeo de pneumococos pode ser mais eficazmente prevenido, assim atenuando infecção em seu estágio inicial). Embora a vacina da invenção possa ser administrada como uma única dose, componentes desta também podem ser co-administrados juntos no mesmo momento ou em horas diferentes (por exemplo conjugados de sacarídeos pneumocócicos podem ser administrados separadamente, no mesmo momento ou 1-2 semanas depois da administração do qualquer componente de proteína bacteriana da vacina para coordenação ótima das respostas imunes com respeito uma a outra). Para co-administração, o adjuvante Th1 opcional pode estar presente em qualquer ou todas as administrações diferentes. Em adição a uma única via de administração, 2 diferentes vias de administração podem ser usadas. Por exemplo, sacarídeos ou conjugados de sacarídeos podem ser administrados IM (ou ID) e proteínas

bacterianas podem ser administradas IN (ou ID). Em adição, as vacinas da invenção podem ser administradas IM para doses preparatórias e IN para doses de reforço.

O conteúdo de antígenos protéicos na vacina tipicamente será no intervalo 1-100μg, opcionalmente 5-50μg, mais tipicamente no intervalo 5 - 25μg. Seguindo uma vacinação inicial, sujeitos podem receber uma ou diversas imunizações de reforço adequadamente espaçadas.

Preparação de vacina geralmente é descrita em Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Encapsulação dentro de lipossomos é descrita por Fullerton, Patente Norte-Americana 4.235.877.

As vacinas ou composições imunogênicas da presente invenção podem ser armazenadas em solução ou liofilizadas. Em uma forma de realização, a solução é liofilizada na presença de um açúcar atuando como um lioprotetor amorfo, tal como sucrose, trealose, glicose, manose, maltose ou lactose. Em uma forma de realização, a solução é liofilizada na presença de um açúcar atuando como um lioprotetor amorfo, e um agente encorpante fornecendo estrutura de massa melhorada tal como glicina ou manitol. A presença de um agente encorpante cristalino permite encurtar ciclos de liofilização, na presença de alta concentração salina. Exemplos de tais misturas para uso em liofilização das composições imunogênicas ou vacinas da invenção incluem sucrose/glicina, trealose/glicina, glicose/glicina, manose/glicina, maltose/glicina, sucrose/manitol/ trealose/manitol, glicose/manitol, manose/manitol e maltose/manitol. Tipicamente a proporção molar dos dois constituintes é opcionalmente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 ou 1:6. Composições imunogênicas da invenção opcionalmente compreendem os reagentes de liofilização descritos acima.

Os agentes estabilizantes acima e misturas de agentes estabilizantes podem incluir adicionalmente um polímero capaz de aumentar a

temperatura de transição de vidro (Tg') da formulação, tal como poli(vinil-pirrolidona) (PVP), hidroxietil amido ou dextrana, ou um polímero atuando como um agente encorpante cristalino tal como polietilenoglicol (PEG) por exemplo tendo um peso molecular entre 1500 e 6000 e dextrana.

As composições imunogênicas da invenção opcionalmente são liofilizadas e extemporaneamente reconstituídas antes de uso. Liofilização pode resultar em uma composição (vacina) mais estável e possivelmente pode levar a maiores títulos de anticorpo na presença de 3D-MPL e na ausência de um adjuvante baseado em alumínio.

Em um aspecto da invenção é fornecido um kit de vacina, compreendendo um frasco contendo uma composição imunogênica da invenção, opcionalmente em forma liofilizada, e compreendendo adicionalmente um frasco contendo um adjuvante como descrito neste lugar. É contemplado que neste aspecto da invenção, o adjuvante será usado para reconstituir a composição imunogênica liofilizada.

Embora as vacinas da presente invenção possam ser administradas por qualquer via, administração das vacinas descritas na pele (ID) forma uma forma de realização da presente invenção. Pele humana compreende uma cutícula "áspera" exterior, chamada o estrato córneo, que cobre a epiderme. Embaixo desta epiderme está uma camada chamada derme, que por sua vez cobre o tecido subcutâneo. Pesquisadores mostraram que injeção de uma vacina na pele, e em particular na derme, estimula uma resposta imune, o que também pode estar associado com diversas vantagens adicionais. Vacinação intradérmica com as vacinas descritas neste lugar forma uma característica opcional da presente invenção.

A técnica convencional de injeção intradérmica, o "procedimento de mantoux", compreende etapas de limpar a pele, e então esticar com uma mão, e com o bisel de uma agulha de bitola estreita (bitola 26-31) virado para cima a agulha é inserida em um ângulo de entre 10-15°.

Uma vez que o bisel da agulha é inserido, o cilindro da agulha é abaixado e adicionalmente avançado enquanto que fornecendo uma leve pressão para elevá-la sob a pele. O líquido é então injetado muito lentamente com isso formando uma pústula ou protuberância na superfície de pele, seguido por lenta retirada da agulha.

Mais recentemente, dispositivos que são construídos especificamente para administrar agentes líquidos em ou através da pele foram descritos, por exemplo os dispositivos descritos em Patente Internacional 99/34850 e Patente Européia 1092444, também os dispositivos de injeção a jato descritos por exemplo em Patente Internacional 01/13977; Patente Norte-Americana 5.480.381, Patente Norte-Americana 5,599.302, Patente Norte-Americana 5.334.144, Patente Norte-Americana 5.993.412, Patente Norte-Americana 5.649.912, Patente Norte-Americana 5,569.189, Patente Norte-Americana 5.704.911, Patente Norte-Americana 5.383.851, Patente Norte-Americana 5.893.397, Patente Norte-Americana 5.466.220, Patente Norte-Americana 5.339.163, Patente Norte-Americana 5.312.335, Patente Norte-Americana 5,503.627, Patente Norte-Americana 5,064.413, Patente Norte-Americana 5,520.639, Patente Norte-Americana 4.596.556, Patente Norte-Americana 4.790.824, Patente Norte-Americana 4.941.880, Patente Norte-Americana 4.940.460, Patente Internacional 97/37705 e Patente Internacional 97/13537. Métodos alternativos de administração intradérmica das preparações de vacina podem incluir seringas e agulhas convencionais, ou dispositivos construídos para liberação balística de vacinas sólidas (Patente Internacional 99/27961), ou emplastros transdérmicos (Patente Internacional 97/48440; Patente Internacional 98/28037); ou aplicados à superfície da pele (liberação transdérmica ou transcutânea Patente Internacional 98/20734; Patente Internacional 98/28037).

Quando as vacinas da presente invenção são para serem administradas para a pele, ou mais especificamente na derme, a vacina está

em um volume líquido baixo, particularmente um volume de entre cerca de 0,05 ml e 0,2 ml.

O conteúdo de antígenos nas vacinas de pele ou intradérmicas da presente invenção pode ser similar a doses convencionais como encontrado em vacinas intramusculares (veja acima). Entretanto, é uma característica de vacinas de pele ou intradérmicas que as formulações possam ser de "baixa dose". Por conseguinte os antígenos protéicos em vacinas de "baixa dose" opcionalmente estão presente em tão pouco quanto 0,1 a 10μg ou 0,1 a 5 μg por dose; e os antígenos de sacarídeo (opcionalmente conjugados) podem estar presentes no intervalo de 0,01-1μg, ou entre 0,01 a 0,5 μg de sacarídeo por dose.

Como usado neste lugar, o termo “liberação intradérmica" significa liberação da vacina para a região da derme na pele. Entretanto, a vacina não estará necessariamente localizada exclusivamente na derme. A derme é a camada na pele localizada entre cerca de 1,0 e cerca de 2,0 mm da superfície em pele humana, mas existe uma certa quantidade de variação entre indivíduos em diferentes partes do corpo. Em geral, pode ser esperado que ela atinja a derme indo 1,5 mm abaixo da superfície da pele. A derme está localizada entre o estrato córneo e a epiderme na superfície e na camada subcutânea abaixo.

Dependendo do modo de liberação, a vacina pode essencialmente estar localizada somente ou primariamente dentro da derme, ou ela pode essencialmente estar distribuída dentro da epiderme e da derme.

A presente invenção fornece adicionalmente uma vacina melhorada para a prevenção ou melhora de Otite média causada por Haemophilus influenzae pela adição de proteínas de Haemophilus influenzae, por exemplo proteína D em forma livre ou conjugada. Em adição, a presente invenção fornece adicionalmente uma vacina melhorada para a prevenção ou melhora de infecção pneumocócica em bebês (e.g., Otite média), recorrendo à

adição de uma ou duas proteínas pneumocócicas como proteína livre ou conjugada às composições conjugadas de S. pneumoniae da invenção. Ditas proteínas livres de pneumococos podem ser as mesmas ou diferentes de quaisquer proteínas de S. pneumoniae usadas como proteínas carreadoras. Um ou mais antígenos protéicos de Moraxella catarrhalis também pode estar incluídos na vacina de combinação em uma forma livre conjugada. Assim, a presente invenção é um método melhorado para obter uma resposta imune (protetora) contra Otite média em bebês.

Em outra forma de realização, a presente invenção é um método melhorado para obter uma resposta imune (protetora) em bebês (definidos como de 0-2 anos de idade no contexto da presente invenção) administrando uma quantidade segura e eficaz da vacina da invenção [uma vacina pediátrica]. Formas de realização adicionais da presente invenção incluem o fornecimento das composições conjugadas antigênicas de S. pneumoniae da invenção para uso em medicina e o uso dos conjugados de S. pneumoniae da invenção na fabricação de um medicamento para a prevenção (ou tratamento) de doença pneumocócica.

Em ainda outra forma de realização, a presente invenção é um método melhorado para obter uma resposta imune (protetora) na população idosa (no contexto da presente invenção um paciente é considerado idoso se ele tem 50 anos ou mais de idade, tipicamente mais de 55 anos e mais geralmente mais de 60 anos) administrando uma quantidade segura e eficaz da vacina da invenção, opcionalmente em conjunção com uma ou duas proteínas de S. pneumoniae presentes como proteína livre ou conjugada, cujas proteínas livres de S. pneumoniae podem ser as mesmas ou diferentes que quaisquer proteínas de S. pneumoniae usadas como proteínas carreadoras.

Um aspecto adicional da invenção é um método de imunizar um hospedeiro humano contra doença causada por S. pneumoniae e opcionalmente infecção por Haemophilus influenzae compreendendo

administrar ao hospedeiro uma dose imunoprotetora da composição imunogênica ou vacina ou kit da invenção.

Um aspecto adicional da invenção é uma composição imunogênica da invenção para uso no tratamento ou prevenção de doença causada por S.pneumoniae e opcionalmente infecção por Haemophilus influenzae.

Um aspecto adicional da invenção é uso da composição imunogênica ou vacina ou kit da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças causadas por S. pneumoniae e opcionalmente infecção por Haemophilus influenzae.

Os termos “compreendendo", "compreendem" e "compreende" neste lugar são pretendidos pelos requerentes para serem opcionalmente substituíveis pelos termos “consistindo de", "consistem de" e "consiste de', respectivamente, em todas as instâncias.

Formas de realização neste lugar se referindo a "composições de vacina" da invenção também são aplicáveis a formas de realização se referindo a "composições imunogênicas" da invenção, e vice versa.

Todas as referências ou pedidos de patente citados dentro deste relatório de patente são incorporados por referência neste lugar.

A fim de que esta invenção possa ser melhor compreendida, os exemplos seguintes são apresentados. Estes exemplos são para propósitos de ilustração apenas, e não são para serem interpretados como limitando o escopo da invenção em qualquer maneira.

<u>Exemplos</u>

Exemplo 1: EXPRESSÃO DE PROTEÍNA D

Proteína D de Haemophilus influenzae

Construção genética para expressão de proteína D

Materiais iniciais

O DNA codificando Proteína D

Proteína D é altamente conservada entre H. influenzae de

todos os sorotipos e linhagens não tipáveis. O vetor pHIC348 contendo a seqüência de DNA codificando o gene inteiro de proteína D foi obtido a partir de Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmo General Hospital, Malmo, Sweden. A seqüência de DNA de proteína D foi publicada por Janson et al. (1991) Infect. Immun. 59: 119125.

O vetor de expressão pMG1

O vetor de expressão pMG1 é um derivado de pBR322 (Gross et a!., 1985) no qual elementos de controle derivados de bacteriófago A para transcrição e tradução de genes exógenos inseridos foram introduzidos (Shatzman et at., 1983). Em adição, o gene de resistência a Ampicilina foi trocado com o gene de resistência a Canamicina.

A linhagem AR58 de E. coli

A linhagem AR58 de E. coli foi gerada por transdução de N99 com um estoque de fago P1 previamente crescido em um derivado de SA500 (galE::TN10, lambdaKil$^-$ c1857 AH1). N99 e SA500 são linhagens K12 de E. coli derivadas de laboratório do Dr. Martin Rosenberg no National Institute of Health.

O vetor de expressão pMG 1

Para a produção de proteína D, o DNA codificando a proteína foi clonado no vetor de expressão pMG 1. Este plasmídeo utiliza sinais de DNA de lambdafago para dirigir a transcrição e tradução de genes exógenos inseridos. O vetor contém o promotor PL, operador OL e dois sítios de utilização (NutL e NutR) para aliviar efeitos de polaridade transcricional quando proteína N é fornecida (Gross et al., 1985). Vetores contendo o promotor PL, são introduzidos em um hospedeiro lisogênico de E. coli para estabilizar o DNA de plasmídeo. Linhagens hospedeiras lisogênicas contêm DNA de lambdafago com defeito de replicação integrado no genoma (Shatzman et al., 1983). O DNA cromossômico de lambdafago dirige a síntese da proteína repressora de cl que se liga ao repressor de OL do vetor e

previne ligação de RNA polimerase ao promotor PL e com isso transcrição do gene inserido. O gene cl da linhagem de expressão AR58 contém um mutante sensível à temperatura de forma que transcrição dirigida por PL pode ser regulada por mudança de temperatura, i.e. um aumento em temperatura de cultura inativa o repressor e síntese da proteína exógena é iniciada. Este sistema de expressão permite síntese controlada de proteínas exógenas especialmente daquelas que podem ser tóxicas para a célula (Shimataka & Rosenberg, 1981).

A linhagem AR58 de E. coli

A linhagem AR58 lisogênica de E. coli usada para a produção do carreador de proteína D é uma derivada da linhagem K12 de E. coli de padrão NIH N99 (F^- su^- galK2, $lacZ^-$ thr). Ela contém um lambdafago lisogênico defeituoso (galE::TN10, lambdaKir c1857 AH1). O fenótipo Kil previne o bloqueio de síntese macromolecular de hospedeiro. A mutação c1857 confere uma lesão sensível à temperatura ao repressor de cl. A deleção AH1 remove o operon direito de lambdafago e os locus bio, uvr3, e chlA de hospedeiros. A linhagem AR58 foi gerada por transdução de N99 com um estoque de fago P1 previamente crescido em um derivado de SA500 (galE::TN10, IambdaKir c1857 AH1). A introdução do lisógeno defeituoso em N99 foi selecionada com tetraciclina por virtude da presença de um transposon TN10 codificando para resistência a tetraciclina no gene adjacente galE.

Construção de vetor pMGMDPPrD

O vetor pMG 1 que contém o gene codificando a proteína não estrutural S1 de vírus de Influenzae (pMGNSI) foi usado para construir pMGMDPPrD. O gene de proteína D foi amplificado por PCR a partir do vetor pHIC348 (Janson et al. 1991 Infect. Immun. 59:119-125) com iniciadores de PCR contendo sítios de restrição Ncol e Xbal nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O fragmento Ncol/Xbal foi então

introduzido em pMGNS1 entre NcoI e XbaI assim criando uma proteína de fusão contendo os 81 aminoácidos N-terminais da proteína NS1 seguidos pela proteína PD. Este vetor foi rotulado pMGNS1 PrD. Baseado na construção descrita acima a construção final para expressão de proteína D foi gerada. Um fragmento BamHI/BamHI foi removido de pMGNS1 PrD. Esta hidrólise de DNA remove a região de codificação de NS1, exceto para os primeiros três resíduos N-terminais. Mediante religação do vetor um gene codificando uma proteína de fusão com a seguinte seqüência de aminoácidos N-terminal foi gerado:

----- MDP SSHSSNMANT-----

NS1 Proteína D

A proteína D não contém um peptídeo líder ou a cisteína N-terminal a qual cadeias lipídicas normalmente são acopladas. A proteína portanto não é nem excretada no periplasma nem lipidada e permanece no citoplasma em uma forma solúvel.

A construção final pMG-MDPPrD foi introduzida na linhagem hospedeira AR58 por choque térmico a 37 °C. Plasmídeo contendo bactérias foram selecionados na presença de Canamicina. Presença do inserto de DNA codificando proteína D foi demonstrada por digestão de DNA isolado de plasmídeo com endonucleases selecionadas. A linhagem recombinante de E. coli é referida como ECD4.

Expressão de proteína D está sob o controle do promotor P_L/ Operador OL lambda. A linhagem hospedeira AR58 contém um gene cI sensível à temperatura no genoma que bloqueia expressão de P_L lambda em temperatura baixa se ligando a O_L. Uma vez que a temperatura é elevada cI é liberado de O_L e proteína D é expressa.

Preparação em pequena escala

No final da fermentação as células são concentradas e congeladas.

A extração de células coletadas e a purificação de proteína D foram realizadas como segue. A pelota congelada de cultura celular é descongelado e ressuspenso em uma solução de rompimento de células (tampão Citrato pH 6,0) para um OD_{650} final = 60. A suspensão é passada duas vezes através de um homogeneizador de alta pressão a P = 1000 bar. O homogenado de cultura celular é clarificado por centrifugação e fragmento celular é removido por filtração. Na primeira etapa de purificação o lisado filtrado é aplicado a uma coluna de cromatografia de troca catiônica (SP Sepharose Fast Flow). PD se liga à matriz de gel por interação iônica e é eluído por um aumento marcado da força iônica do tampão de eluição.

Em uma segunda etapa de purificação impurezas são retidas em uma matriz de troca aniônica (Q Sepharose Fast Flow). PD não se liga no gel e pode ser coletado no fluxo passante.

Em ambas as etapas de cromatografia de coluna coleta de fração é monitorada por OD. O fluxo passante da cromatografia de coluna de troca aniônica contendo a proteína D purificada é concentrado por ultrafiltração.

A proteína D contendo retentato de ultrafiltração finalmente é passada através de uma membrana de 0,2 pm.

Preparação em Grande Escala

A extração de células coletadas e a purificação de proteína D foram realizadas como segue. O caldo coletado é resfriado e diretamente passado duas vezes através de um homogeneizador de alta pressão em uma Pressão de cerca de 800 bars.

Na primeira etapa de purificação o homogenado de cultura celular é diluído e aplicado a uma coluna de cromatografia de troca catiônica (microesferas SP Sepharose Big). PD se liga à matriz de gel por interação iônica e é eluído por um aumento marcado da força iônica do tampão de eluição e filtrado.

Em uma segunda etapa de purificação impurezas são retidas em uma matriz de troca aniônica (0 Sepharose Fast Flow). PD não se liga no gel e pode ser coletado no fluxo passante.

Em ambas as etapas de cromatografia de coluna coleta de fração é monitorada por OD. O fluxo passante da cromatografia de coluna de troca aniônica contendo a proteína D purificada é concentrado e diafiltrado por ultrafiltração.

A proteína D contendo retentato de ultrafiltração finalmente é passada através de uma membrana de 0,2 pm.

Exemplo lb: EXPRESSÃO DE PhtD

A proteína PhtD é um membro da família de proteínas de tríade de histidina (Pht) pneumocócica caracterizada pela presença de tríades de histidina (motivo HXXHXH). PhtD é uma molécula de 838 aa e carrega 5 tríades de histidina (veja Patente Internacional de Medhnmune 00/37105 SEQ ID NO: 4 para seqüência de aminoácidos e SEQ ID NO: 5 para seqüência de DNA). PhtD também contém uma região rica em prolina no meio (posição de aminoácidos 348-380). PhtD tem uma seqüência sinal N-terminal de 20 aa com um motivo LXXC.

Construção genética

A seqüência gênica da proteína PhtD madura de Medlmmune (de aa 21 a aa 838) foi transferida recombinantemente para E. coli usando o vetor doméstico pTCMP14 carregando o promotor pλ. A linhagem hospedeira de E. coli é AR58, a qual carrega o repressor termossensível de cI857, permitindo indução térmica do promotor.

Reação em cadeia da polimerase foi realizada para amplificar o gene phtD de um plasmídeo de MedIrnmune (carregando o gene phtD de linhagem Norway 4 de Streptococcus pneumoniae (sorotipo 4) – SEQ ID NO: 5 como descrito em Patente Internacional 00/37105). Iniciadores, específicos para o gene phtD apenas, foram usados para amplificar o gene phtD em dois

fragmentos. Iniciadores carregam ou os sítios de restrição NdeI e KpnI ou o Kpni e XbaI. Estes iniciadores não hibridizam com qualquer nucleotídeo do vetor mas apenas com seqüências gênicas específicas de phtD. Um códon de início artificial ATG foi inserido usando o primeiro iniciador carregando o sítio de restrição NdeI. Os produtos gerados por PCR foram então inseridos no vetor de clonagem pgEM-T (Promega), e a seqüência de DNA foi confirmada. Subclonagem dos fragmentos no vetor de expressão TCMP14 foi então realizada usando técnicas padrão e o vetor foi transformado em E. coli AR58.

Purificação de PhtD

Purificação de PhtD é atingida como segue:

[a] Crescimento de células de E.coli na presença de Canamicina: 30 horas de crescimento a 30 °C então indução por 18 horas a 39,5 °C

○ Ruptura das células de E.coli de cultura total a OD ±115 em presença de 5 mM de EDTA e 2mM de PMSF como inibidores de protease: Rannie, 2 passagens, 1000 bars.

○ Captura de antígeno e remoção de fragmentos celulares em cromatografia Streamline Q XL de modo de cama expandida em temperatura ambiente (20°C); a coluna é lavada com 150 mM de NaCl + Empigen 0,25% pH 6,5 e eluída com 400 mM de NaCl + Empigen 0,25% em 25 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,4.

○ Filtração em cartucho de Sartobran 150 (0,45 + 0,2 pm)

○ Ligação de antígeno em cromatografia Zn^{++} Chelating Sepharose FF IMAC em pH 7,4 em presença de 5 mM de imidazol a 4°C; a coluna é lavada com 5 mM de Imidazol e Empigen 1% e eluída com 50 mM de imidazol, ambos em 25 mM de tampão fosfato de potássio pH 8,0.

○ Fraca cromatografia de troca aniônica em modo positivo em Fractogel EMD DEAE em pH 8,0 (25 mM de fosfato de potássio) a 4°C; a coluna é lavada com 140 mM de NaCl e eluída em 200 mM de NaCl enquanto contaminantes (proteínas e DNA) permanecem adsorvidos no trocador.

○ Concentração e ultrafiltração com 2 mM de Na/fosfato de K pH 7,15 em membrana de 50 kDa.

○ Filtração esterilizante do volume purificado em um cartucho de filtro Millipak-20 0,2 pm.

Exemplo 1c: EXPRESSÃO DE PNEUMOLISINA

Pneumolisina pneumocócica foi preparada e destoxificada como descrito em Patente Internacional 2004/081515 e Patente Internacional 2006/032499.

Exemplo 2:

Preparação de conjugados

É bem conhecida na arte como fazer polissacarídeos pneumocócicos purificados. Para os propósitos destes exemplos os polissacarídeos foram feitos essencialmente como descrito em Patente Européia 072513 ou por métodos intimamente relacionados. Antes de conjugação os polissacarídeos podem ser dimensionados por microfluidização como descrito abaixo.

As condições de ativação e acoplamento são específicas para cada polissacarídeo. Estas são dadas em Tabela 1. Polissacarídeo dimensionado (exceto para PS5, 6B e 23F) foi dissolvido em 2M de NaCl, 0,2M de NaCl ou em água para injeção (WFI). A concentração ótima de polissacarídeo foi avaliada para todos os sorotipos. Todos os sorotipos exceto sorotipo 18C foram conjugados diretamente à proteína carreadora como detalhado abaixo. Dois conjugados alternativos de sorotipo 22F foram feitos; um conjugado diretamente, um através de um ligante de ADH.

A partir de uma solução estoque de 100 mg/ml em acetonitrila ou solução 50%/50% de acetonitrila/água, CDAP (proporção CDAP/PS 0,5-1,5 mg/mg de PS) foi adicionado à solução de polissacarídeo. 1,5 minuto depois, 0,2M-0,3M de NaOH foi adicionado para obter o pH específico de ativação. A ativação do polissacarídeo foi realizada neste pH durante 3

minutos a 25 °C. Proteína purificada (proteína D, PhtD, pneumolisina ou DT) (a quantidade depende da proporção inicial de PS/proteína carreadora) foi adicionada ao polissacarídeo ativado e a reação de acoplamento foi realizada no pH específico por até 2 horas (dependendo de sorotipo) sob regulação de pH. A fim de suprimir grupos não reagidos de éster de cianato, uma solução de 2M de glicina foi então adicionada à mistura. O pH foi dimensionado para o pH de supressão (pH 9,0). A solução foi agitada por 30 minutos a 25 °C e então durante a noite a 2-8 °C com agitação contínua lenta.

Preparação de 18C:

18C foi ligado à proteína carreadora através de um ligante – Diidrazida de ácido adípico (ADH)

Polissacarídeo de sorotipo 18C foi microfluidizado antes de conjugação.

Derivação de toxóide de tétano com EDAC

Para derivação do toxóide de tétano, TT purificado foi diluído a 25 mg/ml em 0,2M de NaCl e o espaçador de ADH foi adicionado a fim de atingir uma concentração final de 0,2M. Quando a dissolução do espaçador foi completa, o pH foi dimensionado para 6,2. EDAC (1-etil-3-(3- dimetil-aminopropil) carbodiimida) foi então adicionado para atingir uma concentração final de 0,02M e a mistura foi agitada por 1 hora sob regulação de pH. A reação de condensação foi parada aumentando pH até 9,0 por pelo menos 30 minutos a 25°C.

TT derivado foi então diafiltrado (membrana CO de 10 kDa) a fim de remover ADH residual e reagente EDAC.

Volume de TT_{AH} foi finalmente filtrado de forma estéril até etapa de acoplamento e armazenado a -70°C.

Acoplamento químico de TT_{AH} a PS 18C

Detalhes dos parâmetros de conjugação podem ser encontrados em Tabela 1.

2 gramas de PS microfluidizado foram diluídos na concentração definida em água e dimensionados para 2M de NaCl por adição de NaCl em pó.

Solução de CDAP (100 mg/ml recentemente preparada em 50/50 v/v de acetonitrila/WFI) foi adicionada para atingir a proporção CDAP/OS apropriada.

O pH foi aumentado até o pH de ativação 9,0 pela adição de 0,3M de NaOH e foi estabilizado neste pH até adição de TTAH.

Depois de 3 minutos, TT_{AH} derivado (20 mg/ml em 0,2 M de NaCl) foi adicionado para atingir uma proporção TT_{AH} /PS de 2; o pH foi regulado para o pH de acoplamento 9,0. A solução foi deixada uma hora sob regulação de pH.

Para supressão, uma solução de 2M de glicina, foi adicionada à mistura PS/TTAH/CDAP. O pH foi dimensionado para o pH de supressão (pH 9,0).

A solução foi agitada por 30 min a 25 °C, e então deixada durante a noite a 2-8°C com agitação contínua lenta.

<u>Conjugado PS22F-PhtD</u>

Em um segundo método de conjugação para este sacarídeo (o primeiro sendo o método de conjugação direta de PS22-PhtD mostrado em Tabela 1), 22F foi ligado à proteína carreadora através de um ligante – Diidrazida de ácido adípico (ADH). Polissacarídeo de sorotipo 22F foi microfluidizado antes de conjugação.

Derivação de PS 22F

Ativação e acoplamento são realizados a 25°C sob agitação contínua em um banho-maria com temperatura controlada.

PS22F microfluidizado foi diluído para obter uma concentração final de PS de 6 mg/ml em 0,2M de NaCl e a solução foi dimensionada em pH 6,05 ± 0,2 com 0,1N de HCl.

Solução CDAP (100 mg/ml recentemente preparada em acetonitrila/WFI, 50/50) foi adicionada para atingir a proporção CDAP/PS apropriada (1,5/1 ww).

O pH foi aumentado até o pH de ativação 9,00 +0,05 pela adição de 0,5M de NaOH e foi estabilizado neste pH até adição de ADH.

Depois de 3 minutos, ADH foi adicionado para atingir a proporção ADH/PS apropriada (8,9/1 p/p); o pH foi regulado para pH de acoplamento 9,0. A solução foi deixada por 1 hora sob regulação de pH.

O derivado de PS_{AH} foi concentrado e diafiltrado.

Acoplamento

PhtD a 10 mg/ml em 0,2M de NaCl foi adicionado ao derivado de $PS22F_{AH}$ a fim de atingir uma proporção PhtD/$PS22F_{AH}$ de 4/1 (p/p). O pH foi dimensionado para 5,0 ± 0,05 com HCl. A solução de EDAC (20 mg/ml em 0,1M de Tris-HCl pH 7,5) foi adicionada manualmente em 10 min (250 µl/min) para atingir 1 mg de EDAC/mg de $PS22F_{AH}$. A solução resultante foi incubada por 150 min (embora 60 min também tenham sido usados) a 25°C sob agitação e regulação de pH. A solução foi neutralizada por adição de 1M de Tris-HCl pH 7,5 (1/10 do volume final) e deixada 30 min a 25°C.

Antes da eluição em Sephacryl S400HR, o conjugado foi clarificado usando um filtro Minisart de 5pm.

O conjugado resultante tem uma proporção PhtD/PS final de 4,1 (p/p), um teor de PS livre abaixo de 1% e uma antigenicidade (a-PS/a-PS) de 36,3% e antigenicidade anti-PhtD de 7,4%.

<u>Purificação dos conjugados:</u>

Os conjugados foram purificados por filtração em gel usando uma coluna de filtração em gel Sephacryl S400HR equilibrada com 0,15M de NaCl (S500HR para 18C) para remover moléculas pequenas (incluindo DMAP) e PS e proteína não conjugada. Baseado nos diferentes tamanhos moleculares dos componentes de reação, conjugados PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-

pneumolisina ou PS-DT são eluídos primeiro, seguido por PS livre, então por PD livre ou DT livre e finalmente DMAP e outros sais (NaCl, glicina).

Frações contendo conjugados são detectadas por $UV_{280\ nm}$. Frações são combinadas de acordo com seu Kd, filtradas de forma estéril (0,22µm) e armazenadas a +2-8°C. As proporções PS/Proteína nas preparações conjugadas foram determinadas.

Condições específicas de ativação/acoplamento/supressão de conjugados de Proteína D/TT/DT/PhtD/Ply de PS de S. pneumoniae

Onde "µfluido" aparece em um cabeçalho de fileira, isto indica que o sacarídeo foi dimensionado por microfluidização antes de conjugação. Tamanhos de sacarídeos seguindo microfluidização são dados em tabela 2.

Tabela 1 Condições específicas de ativação/acoplamento/supressão de conjugados de Proteína D/TT/DT/PhtD/Ply de PS de S. pneumoniae

Sorotipo	1 µfluido	4 µfluido	5	6A	6B	7F µfluido
PS conc.(mg/ml)	2,5	2,5	7,1	5,0	5,0	5,0
PS dissolução	WFI	WFI	WFI	2M de NaCl	2M de NaCl	2M de NaCl
PD conc.(mg/mI)	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0	10,0
Proporção PD/PS inicial (p/p)	1,5/1	1,5/1	1/1	1/1	1,1/1	1,2/1
CDAP conc. (mg/mg PS)	0,50	0,50	0,79	0,83	0,83	0,75
$pFl_a{}^m pFle^z pH_q$	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0

Sorotipo	9V µfluido	14 µfluido	18C µfluido	19A µfluido	19F µfluido	22F µfluido	23F
PS conc.(mg/ml)	5,0	5,0	4,5	15,0	9,0	6,0	2,38
PS dissolução	2M de NaCl	2M de NaCl	2M de NaCl	2M de NaCl	2M de NaCl	0,2M de NaCl	2M de NaCl
Proteína carreadora conc.(mg/m1)	10,0	10,0	20,0 (TT)	10,0' (Ply)	20,0 (DT)	10,0 (PhtD)	5,0
Proporção proteína carreadora/PS inicial (p/p)	1,2/1	1,2/1	2/1	2,5/1	1,5/1	3/1	1/1
CDAP conc. (mg/mg PS)	0,50	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5	0,79
$pFl_a=pFl_c=pH_q$	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0

Observação: pHa,c,q corresponde ao pH para ativação, acoplamento e supressão, respectivamente

Caracterização:

Cada conjugado foi caracterizado e foi de encontro às especificações descritas em Tabela 2. O conteúdo de polissacarídeo (µg/m1) foi medido pelo teste de Resorcinol e o conteúdo de proteína (µg/ml) pelo teste de Lowry. A proporção PS/PD final (p/p) é determinada pela proporção das concentrações.

Conteúdo de polissacarídeo livre (%):

O conteúdo de polissacarídeo livre de conjugados mantido a 4°C ou armazenado 7 dias a 37°C foi determinado no sobrenadante obtido depois de incubação com anticorpos de proteína α-carreadora e sulfato de amônio saturado, seguido por uma centrifugação.

Um ELISA de α-PS/α-PS foi usado para a quantificação de polissacarídeo livre no sobrenadante. A ausência de conjugado também foi

controlada por um ELISA de proteína α-carreadora/α-PS.

Antigenicidade:

A antigenicidade nos mesmos conjugados foi analisada em um ELISA tipo sanduíche caracterizado pelo fato de que a captura e a detecção de anticorpos foram α-PS e α-Proteína respectivamente.

Conteúdo de proteína livre (%):

Proteína carreadora não conjugada pode ser separada do conjugado durante a etapa de purificação. O conteúdo de proteína residual livre foi determinado usando cromatografia de exclusão por tamanho (TSK 5000-PWXL) seguido por detecção de UV (214 nm). As condições de eluição permitiram separar a proteína carreadora livre e o conjugado. Conteúdo de proteína livre em volumes de conjugado foi então determinado versus uma curva de calibração (de 0 a 50 µg/ml de proteína carreadora). Proteína carreadora em % foi obtido como segue: % de carreador livre = (carreador livre (µg/m1)/ (concentração total de proteína carreadora correspondente medida por Lowry (µg/ml) * 100%).

Estabilidade:

Distribuição de peso molecular (K_{av}) e estabilidade foi medida em uma filtração em gel HPLC-SEC (TSK 5000-PWXL) para conjugados mantidos a 4°C e armazenados por 7 dias a 37°C.

A caracterização de 10/11/13/14-valentes é dada em Tabela 2 (veja comentário abaixo desta).

Os conjugados protéicos podem ser adsorvidos em fosfato de alumínio e combinados para formar a vacina final.

Conclusão:

Conjugados imunogênicos foram produzidos, que desde então mostraram ser componentes de uma vacina promissora.

TABELA 2 — características dos conjugados

Conjugados	Tamanho de PS (Da10x^3)	Proporção Carreador/ PS	PS livre (Elisa)	Carreador livre	PS Antigenicidade (Elisa)	Tamanho de Conj. (kDa)
PS1-PD	349-382*	1,5-1,6	1,0%-1,2%	3,9%-4,8%	87%-95%	1499 - 1715
PS4-PD	93-100*	1,5-1,6	4,7-6,5%	3,2%-4,0%	90%-96%	1303 - 1606
PS5-PD***	367-443	0,80	8,7-11,2%	2,2%-3,8%	93%-108%	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0,61	4,5%	Não feito	45,9%	Não feito
PS6B-PD***	1069-1391	0,7-0,8	1,3-1,6%	<2,0%	68%-75%	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1,1-1,2	<1%	<1,4%	58%	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1,3-1,5	<1%	<1,3%	67%-69%	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1,4	<1%	<1,5%	70%	3430-3779
PS18C-TT$^-$	89-97*	2,2-2,4	1,5-2,2%	<4%	46%-56%	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3,2	<1%		29%	
PS19F-DT	133-143*	1,4-1,5	4,1%-5,9%	<1,2%-<1,3%	82%-88%	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2,17	5,8	Não feito	37%	Não feito
PS22F-AHPhtD*159-167		3,66-4,34	<1%	Não feito	28-31%	Não feito
PS23F-PD***	914-980	0,5	1,4-1,9%	3,7%-4,9%	137%-154%	2933-3152

* Tamanho de PS seguindo microfluidização do PS nativo

Uma vacina com 10 valências foi feita misturando conjugados de sorotipo 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F (e.g. em uma dose de 1, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1 μg de sacarídeo, respectivamente por dose humana). Uma vacina com 11 valências foi feita adicionando posteriormente o conjugado de sorotipo 3 de Tabela 5 (e.g. a 1 μg de sacarídeo por dose humana). Uma vacina com 13 valências foi feita adicionando posteriormente os conjugados de sorotipos 19A e 22F acima (com 22F ou diretamente ligado a PhtD, ou alternativamente através de um ligante de ADH) [e.g. em uma dose de 3 μg de cada de sacarídeo por dose humana]. Uma vacina com 14 valências pode ser feita adicionando posteriormente o conjugado de sorotipo 6A acima [e.g. em

uma dose de 1μg de sacarídeo por dose humana.

Exemplo 3: Evidência de que inclusão de proteína D de Haemphilus influenzae em uma composição imunogênica da invenção pode fornecer proteção melhorada contra otite média aguda (AOM).

Construção de estudo.

O estudo usou uma vacina 11Pn-PD– compreendendo sorotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F cada conjugado a proteína D de H. influenzae (se referir a Tabela 5 em exemplo 4). Sujeitos foram aleatorizados em dois grupos para receber quatro doses ou da vacina 11Pn-PD ou Havrix em aproximadamente 3, 4, 5 e 12-15 meses de idade. Todos os sujeitos receberam vacina Infanrix-hexa (DTPa-HBV-IPV/Hib) de GSK Biological concomitantemente em 3, 4 e 5 meses de idade. Infanrix-hexa é uma combinação de Pediarix e Hib misturados antes de administração. Acompanhamento de eficácia para a análise "de Acordo com Protocolo" começou 2 semanas depois de administração da terceira dose de vacina e continuou até 24-27 meses de idade. Transporte nasofaríngeo de S. pneumoniae e H. influenzae foi avaliado em um subconjunto selecionado de sujeitos.

Pais foram avisados para consultar o investigador se seu filho ficasse doente, tivesse dor de ouvido, perfuração espontânea da membrana timpânica ou otorréia espontânea. Se o investigador suspeitou de um episódio de AOM, a criança foi imediatamente referida para um especialista em Ouvido, Nariz e Garganta (ENT) para confirmação da diagnose.

Uma diagnose clínica de AOM foi baseada ou na aparência visual da membrana timpânica (i.e. vermelhidão, protuberante, perda de reflexo luminoso) ou na presença de efusão fluida de ouvido médio (como demonstrado por otoscopia simples ou pneumática ou por microscopia). Em adição, pelo menos dois dos seguintes sinais ou sintomas tiveram que estar presentes: dor de ouvido, otorréia, perda de audição, febre, letargia,

irritabilidade, anorexia, vômitos, ou diarréia. Se o especialista em ENT confirmou a diagnose clínica, um espécime de fluido de ouvido médio foi coletado por timpanocentese para exame bacteriológico.

Para sujeitos com ocorrências repetidas de doença, um novo episódio de AOM foi considerado como tendo começado se mais do que 30 dias se passaram desde o início do episódio prévio. Em adição, um episódio de AOM foi considerado como sendo um novo episódio bacteriano se a bactéria/sorotipo isolado diferiu do isolado prévio qualquer que seja o intervalo entre os dois episódios consecutivos.

Resultados de ensaio

Um total de 4968 bebês foram arrolados, 2489 no grupo 11 Pn-PD e 2479 no grupo de controle. Não houve grandes diferenças nas características demográficas ou fatores de risco entre os dois grupos.

Episódios clínicos e uma definição de caso de A OM

Durante o período para acompanhamento de protocolo, um total de 333 episódios de AOM clínica foram registrados no grupo 11 Pn-PD e 499 no grupo de controle.

Tabela 3 apresenta a eficácia protetora da vacina 11 Pn-PD e ambas as vacinas de 7 valências previamente testadas em Finlândia (Eskola et al N Engl J Med 2001; 344: 403 – 409 e Kilpi et alClin Infect Dis 2003 37:1155-64) contra qualquer episódio de AOM e AOM causado por diferentes sorotipos pneumocócicos, H. influenzae, NTHi e M. catarrhalis. Redução estatisticamente significante e clinicamente relevante em 33,6% da carga total de doença AOM foi atingida com 11 Pn-PD, independente da etiologia (tabela 3).

A eficácia total contra episódios de AOM devido a qualquer dos 11 sorotipos pneumocócicos contidos na vacina 11 Pn-PD foi 57,6% (tabela 3).

Outro importante resultado no estudo atual é a proteção de

35,6% fornecida pela vacina 11 Pn-PD contra AOM causado por H. influenzae (e especificamente proteção de 35,3% fornecida por NTHi). Este resultado é de grande significância clínica, dada a importância aumentada de H. influenzae como uma causa principal de AOM na era de vacina pneumocócica conjugada. Em linha com a proteção fornecida contra AOM, a vacina 11 Pn-PD também reduziu transporte nasofaríngeo de H. influenzae seguindo a dose de reforço no segundo ano de vida. Estes resultados estão em contraste com observações prévias em Finlândia onde, para ambas as vacinas pneumocócicas conjugadas de 7 valências, um aumento em episódios de AOM devido a H. influenzae foi observado, (Eskola et al and Kilpi et al) como evidência de substituição etiológica.

Uma clara correlação entre proteção contra episódios de AOM devido a Hi e níveis de anticorpo contra a proteína carreadora D não pode ser estabelecida, pois concentrações pós-primárias de anticorpo IgG anti-PD em vacinas 11 Pn-PD, que permaneceram livres de episódio de Hi AOM, foram essencialmente as mesmas que níveis pós-primários de anticorpo IgG anti-PD medidos em vacinas 11 Pn-PD que desenvolveram pelo menos um episódio de Hi AOM durante o período de acompanhamento de eficácia. Entretanto, embora nenhuma correlação possa ser estabelecida entre o impacto biológico da vacina e a imunogenicidade pós-primária de IgG anti-PD, é razoável assumir que a proteína carreadora PD, que é altamente conservada entre linhagens de H. influenzae, contribuiu em um grande grau na indução da proteção contra Hi.

O efeito em doença AOM foi acompanhado por um efeito em transporte nasofaríngeo que foi de magnitude similar para pneumococos de sorotipo de vacina e H. influenzae (Figura 1). Esta redução do transporte nasofaríngeo de H. influenzae nas vacinas conjugadas a PD suporta a hipótese de um efeito protetor direto da vacina conjugada a PD contra H. influenzae, mesmo se a eficácia protetora não pode ser correlacionada às respostas

imunes de anti-PD IgG se medidas por ELISA.

Em um experimento seguinte um modelo de otite média de chinchila foi usado com combinações de soro de bebês imunizados com a formulação de 11 valências deste exemplo ou com a vacina de 10 valências de Exemplo 2 (veja também Tabela 1 e 2 e comentários abaixo destas). Ambas as combinações induzem uma redução significante da porcentagem de animais com otite média versus a combinação de soro pré-imune. Não existe diferença significante entre as combinações imunes de 10 e 11 valências. Isto demonstra que ambas as vacinas têm um potencial similar para induzir proteção contra otite média causada por H. influenzae não tipável neste modelo.

Tabela 3

Tipo de episódio de AOM	11Pn-PD					Prevnar em FinOM Eskola et 81)					7v-OMP em FinOM (K °p et al)				
	n		VE			n		VE			n		VE		
	11Pn-PD	Controle	%	95%CI LL	95%CI UL	7v-CRM	Controle	%	95%CI LL	95%CI UL	7v-OMP	Controle	%	95% CI LL	95% CI UL
NI	2455	2452				786	794				805	794			
Qualquer AOM	333	499	33,6	20,8	44,3	1251	1345	6	-4	16	1364	1345	-1	-12	10
Qualquer AOM com MEF	322	474	32,4	19,0	416	1177	1267	7	-5	17	1279	1267	0	-12	10
Pneumococcus confirmado em cultura	92	189	51,5	36,8	62,9	271	414	34	21	45	314	414	25	11	37
Sorotipos pneumocócicos de vacina	60	141	57,6	41,4	69,3	107	250	57	44	67	110	250	56	44	66
Outros patógenos bacterianos															
H. influenzae	44	68	35,6	3,8	57,0	315	287	-11	-34	8	315	287	-9	-32	10
H. influenzae não tipável (NTHi)	41	63	35,3	1,8	57,4	NP	NIP	NP	NP	NP	NIP	NP	NC	NP	NP
M. catarrhalis	31	34	9,4	-52,5	46,1	379	381	-1	-19	15	444	381	-16	-36	2

NP = Não publicado; N = número de sujeitos em coorte de eficácia de ATP; n = número de episódios

Sorotipos pneumocócicos de vacina: para 11 Pn-PD = 11 sorotipos, para Prevna e 7v-OMP = 7 sorotipos MEF = Fluido de ouvido médio

Exemplo 4:

Seleção de proteína carreadora para sorotipo 19F

Ensaio ELISA usado

O método ELISA de inibição de 22F foi essencialmente baseado no ensaio proposto em 2001 por Concepcion e Frasch e foi relatado por Henckaerts et al., 2006, Clinical and Vaccine Immunology 13:356-360. Resumidamente, polissacarídeos pneumocócicos purificados foram misturados com albumina de soro humano metilada e adsorvidos em placas de microtítulo de alta ligação Nunc MaxisorpTM (Roskilde, DK) durante a noite a 4°C. As placas foram bloqueadas com 10% de soro bovino fetal (FBS) em PBS por 1 hora em temperatura ambiente com agitação. Amostras de soro foram diluídas em PBS contendo 10% de FBS, 10 μg/mL de polissacarídeo de parede celular (SSI) e 2 μg /mL de polissacarídeo pneumocócico de sorotipo 22F (ATCC), e adicionalmente diluídas nas placas de microtítulo com o mesmo tampão. Uma referência interna calibrada contra o soro padrão 89-SF usando as concentrações de IgG específicas de sorotipo em 89-SF foi tratada da mesma maneira e incluída em cada placa. Depois de lavagem, os anticorpos ligados foram detectados usando anticorpo monoclonal anti-IgG humana conjugado a peroxidase (Stratech Scientific Ltd., Soham, UK) diluído em 10% de FBS (em PBS), e incubados por 1 hora em temperatura ambiente com agitação. A cor foi desenvolvida usando kit pronto para uso de substrato de imunoensaio de enzima tetrametilbenzidina peroxidase de único componente (BioRad, Hercules, CA, US) no escuro em temperatura ambiente. A reação foi parada com 0,18 M de H2SO4, e a densidade ótica foi lida em 450 nm. Concentrações de IgG específicas de sorotipo (em μg/mL) nas amostras foram calculadas fazendo referência a pontos de densidade ótica dentro de limites definidos para a curva de soro de referência interna, que foi modelada por uma equação log logística de 4 parâmetros calculada com aplicativo computacional SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale,

CA). O ponto de corte para o ELISA foi 0,05 μg/mL de IgG para todos os sorotipos levando em conta o limite de detecção e o limite de quantificação.

Ensaio de opsonofagocitose

No encontro de consultoria de WHO em Junho de 2003, foi recomendado usar um ensaio OPA como especificado em Romero-Steiner et al Clin Diagn Lab Immunol 2003 10 (6): pp1019- 1024. Este protocolo foi usado para testar a atividade de OPA dos sorotipos nos seguintes testes.

Preparação de conjugados

Em estudos 11Pn-PD&Di-001 e 11Pn-PD&Di-007, três formulações de vacinas de 11 valências (Tabela 4) foram incluídas nas quais 3μg do polissacarídeo 19F foi conjugado a toxóide de difteria (19F-DT) ao invés de 1μg de polissacarídeo conjugado a proteína D (19F-PD). Parâmetros de conjugação para os estudos 11 Pn-PD, 11 Pn-PD&Di-001 e 11 Pn-PD&Di-007 são descritos em Tabelas 5, 6 e 7 respectivamente.

Respostas de anticorpo antipneumocócico e atividade de OPA contra sorotipo 19F um mês depois de vacinação primária com estas formulações 19F-DT são mostradas em Tabela 8 e 9 respectivamente.

Tabela 10 mostra concentrações de anticorpo 22F em ELISA e porcentagens de sujeitos atingindo o limiar de 0,2 μg/mL antes e depois de vacinação de reforço com polissacarídeo simples de 23 valências.

A atividade opsonofagocítica foi mostrada como sendo claramente melhorada para anticorpos induzidos com estas formulações 19F-DT como demonstrado por taxas de soropositividade maiores (títulos opsonofagocíticos $\geq$ 1:8) e GMTs de OPA um mês depois de vacinação primária (Tabela 9). Um mês depois de vacinação de reforço com polissacarídeo simples de 23 valências, atividade opsonofagocítica de anticorpos 19F permaneceu significantemente melhor para crianças carregadas com formulações 19F-DT (Tabela 11).

Tabela 12 apresenta dados de imunogenicidade seguindo uma

dose de reforço de 11 Pn-PD em bebês previamente imunizados com conjugados 19F-DT ou 19F-PD comparado com uma quarta dose consecutiva de Prevnar®. Dados os casos de grandes avanços relatados depois da introdução de Prevnar® nos Estados Unidos da América, a atividade opsonofagocítica melhorada contra sorotipo 19F quando conjugado à proteína carreadora DT pode ser uma vantagem para a vacina candidata.

Tabela 13 fornece dados de ELISA e OPA para o conjugado 19F-DT com respeito ao sorotipo 19^{A} de reatividade cruzada. Foi encontrado que 19F-DT induz baixa mas significante atividade de OPA contra 19A.

Tabela 4. Formulações de vacina pneumocócica conjugada usadas em estudos clínicos.

Formulação	µg de sorotipo pneumocócico/proteína carreadora											A13* mg
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	< 0,8
19F-DT Form	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/D	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	31DT	5/DT	≤ 0,35
19F-DT Form	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	≤ 0,35
19F-DT Form	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	31DT	3/PD	= 0,5

Tabela 5. Condições específicas de ativação/acoplamento/supressão de conjugados de PS de S.pneumoniae-Proteína D/TT/DT

Sorotipo	1 Nativo	3 µfluido	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F Nativo
conc. de PS (mg/ml)	1,5	2	2,0	7,5	5,5	3,0
Dissolução de PS	NaCl 150mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
conc.de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proporção PS/PD inicial (p/p)	1/0,7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pFl_a=pH_c=pHo	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	8,8/8,8/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0
Tempo de acoplamento	60 mins	60 mins	45 mins	40 mins	60 mins	60 mins

Sorotipo	9V Nativo	14 Nativo	18C Nativo	19F Nativo	23F Nativo
conc. de PS (mg/ml)	1,75	2,5	1,75	4,0	2,5
Dissolução de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M

conc.de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proporção PS/PD inicial (p/p)	1/0,75	1/0,75	1/1,2	1/1	1/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pl-l_a=pFl_c=pH,	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0
Tempo de acoplamento	60 mins	60 mins	45 mins	30 mins	60 mins

Tabela 6 Condições específicas de ativação/acoplamento/supressão de conjugados de PS de S.pneumoniae-Proteína D/DT para o estudo de 11 Pn-PD&Di-001

Sorotipo	1 µfluido	3 µfluido	4 µfluido	5 µfluido	6B µfluido	7F Nativo
conc. de PS (mg/ml)	4	2,0	2,5	7,5	10	3,0
Dissolução de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
conc.de PD (mg/ml)	10,0	5,0	5,0	5,0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5,0
Proporção PS/PD inicial (p/p)	1,2/1	1/1	1/1	1/1	1,5/1	1/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	1,50	0,75	1,5	2	1,5	0,75
pH,=p1-1,=p1-1,	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9/9/9
Tempo de acoplamento	60 mins	60 mins	60 mins	60 mins	60 mins	60 mins

Sorotipo	9V Nativo	14 Nativo	18C µfluido	19F µfluido	23F µfluido
conc. de PS (mg/ml)	1,75	2,5	5,0	9,0	10
Dissolução de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
conc.de proteína carreadora (mg/m1)	5,0	5,0	5,0	20 (DT)	10 (DT)
Proporção proteína carreadora/PS inicial (p/p)	0,75/1	0,75/1	1,2/1	1,5/1	1,5/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	1,5	1,5	0,75
pH_a=pFl_c=pH,	8,5/8,5/9,	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0
Tempo de acoplamento	60 mins	60 mins	30 mins	60 mins	60 mins

Tabela 7 Condições específicas de ativação/acoplamento/supressão de conjugados de PS de S.pneumoniae-Proteína D/DT para o estudo de 11 Pn-PD&Di-007

Sorotipo	1 Nativo	3 µfluido	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F µfluido
conc. de PS (mg/ml)	1,5	2,0	2	7,5	5,5	5,0
Dissolução de PS	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaC1 2M
conc.de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5	10
Proporção PS/PD inicial (p/p)	0,7/1	1/1	1	1/1	1/1	1,2/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH_a=pi-1,=p1-1	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	8,8/8,8/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5./9,5/9
Tempo de acoplamento	60 mins	60 mins	45 mins	40 mins	60 mins	60 mins

Sorotipo	9V µfluido µfluido	14 µfluido	18C Nativo	19F µfluido	19F µfluido	23F µfluido
conc. de PS (mg/ml)	5,0	5,0	1,75	9,0	10,0	9,5
Dissolução de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaC1 2M
conc.de proteína carreadora (mg/m1)	10	10,0	5,0	20 (DT)	5,0 (PD)	10
Proporção proteína carreadora/PS inicial (p/p)	1,2/1	1,2/1	1,2/1	1,5/1	1,2/1	1/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,5	0,75	0,75	1,5	0,75	0,75
pH_a=p1-1,=pH_q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0
Tempo de acoplamento	60 mins	60 mins	45 mins	120 mins	120 mins	60 mins

5

Tabela 8 Porcentagem de sujeitos com concentração de anticorpo 19F ≥ 0,20 μg/mL e concentrações de anticorpo de média geométrica de anticorpo 19F (GMCs com 95% de CI; μg/mL) um mês depois de vacinação primária com 1μg de 19F-PD, 3μg de 19F-DT ou Prevnar (2μg de 19F-CRM) (Coorte total)

Grupo	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA)		
	N	% k 0,20 (95% de CI)	GMC (95% de CI)	N	% 0,20 ug/mL (95% de CI)	GMC (μg/mL) (95% de CI)
11Pn-PD	152	98,7 (95,3-99.8)	1,93 (1,67-2,22)	50	100 (92,9-100)	2,.78 (2,31-3,36)
19F-DT Form	146	99,3 (96,2-100)	2.,88 (2,45-3,38)	-		-
19F-DT Form	150	96,0 (91,5-98,5)	2,43 (2,01-2,94)	-	-	-
19F-DT Form	-		-	50	96,0 (86,3-99,5)	3,70 (2,58-5,30)
Prevnar	148	98,6 (95,2-99,8)	2,.98 (2,60-3,41)	41	97,6 (87,1-99,9)	2.91 (2,15-3,94)

[r] A composição das diferentes formulações é fornecida em tabela 4.

Tabela 9 Porcentagem de sujeitos com título de OPA de 19F 1:8 e GMTs de OPA de 19F um mês depois de vacinação primária com 1μg de 19F-PD, 3μg de 19F-DT ou Prevnar (2μg de 19F-CRM) (Coorte total)

Grupo	11Pn-PD&DI-001			11 Pn-PD&Di-007		
	N	1:8 (95% de CI)	GMT (95% de CI)	N	1:8 (95% de CI)	GMT (95% de CI)
11Pn-PD	136	84,6 (77,4-90,2)	77,8 (58,1-104,4)	46	95,7 (85,2-99,5)	167,8 (118,1-38,6)
19F-DT Form 1[r]	137	95,6 (90,7-98,4)	263,2 (209,4-30,7)	-		-
19F-DT Form 2[r]	139	92,1 (86,3-96,0)	218,9 (166,5-87,9)	-	-	-
19F-DT Form 3[r]	-		-	49	91,8 (80,4-97,7)	403,1 (225,7-19,9)
Prevnar	131	86,3 (79,2-91,6)	82,6 (61,1-111,6)	38	81,6 (65,7-92,3)	65,0 (37,7-112,2)

A composição das diferentes formulações é fornecida em Tabela 4.

Tabela 10 Porcentagem de sujeitos com concentração de anticorpo 19F ≥ 0,20 μg/mL e GMCs de anticorpo 19F (μg/mL) antes de e um mês depois de reforço com polissacarídeo simples de 23 valências em crianças imunizadas com 1μg de 19F-PD, 3μg de 19F-DT ou Prevnar (2μg de 19F-RM) (Coorte total)

Grupo primário	11Pn-PD&DI-002 (22F ELISA)					
	Antes de vacinação de reforço			Um mês após reforço com PS de 23		
	N	%> 0,20 μg/mL (95% de CI)	GMC (μg/ml) (95% de CI)	N	%> 0,20 μg/mL (95% de CI)	GMC (μg/ml) (95% de CI)
11Pn-PD	70	77,1 (65,6-86,3)	0,67 (0,45-0,98)	67	94,0 (85,4-98,3)	11,50 (7,76-17,03)
19F-DT Form 1[F]	68	91,2 (81,8-96,7)	0,71 (0,54-0,94)	69	98,6 (92,2-100)	14,50 (10,47-20,07)
19F-DT Form 2[r]	74	81,1 70,3-89,3	0,59 (0,43-0,80)	72	95,8 88,3-99.,1	9,90 (6,74-14,54)
Prevnar	65	64,6 (51,8-76,1)	0,40 (0,27-0,60)	67	100 (94,6-100)	9,40 (6,95-12,71)

[r] A composição das diferentes formulações é fornecida em Tabela 4.

Tabela 11 Porcentagem de sujeitos com título de OPA de 19F 1:8 e GMTs de OPA de 19F antes de e um mês depois de reforço com polissacarídeo simples de 23 valências em crianças imunizadas com 1μg de 19F-PD, 3μg de 19F-DT ou Prevnar (2μg de 19F-CRM) (Coorte total)

Grupo primário	11 Pn-PD&Di-002					
	Antes de vacinação de reforço			Um mês após reforço com PS de 23		
	N	%1:8 (95% de CI)	GMT (95% de CI)	N	% 1:8 (95% de CI)	GMT (95% de CI)
11Pn-PD	29	27,6 (12,7-47,2)	10,9 (5,0-23,7)	28	82,1 (63,1-93,9)	408,0 (157,3-1058,3)
19F-DT Form 1[r]	19	47,4 (24,4-71,1)	18,1 (7,2-45,7)	18	94,4 (72,7-99,9)	1063,8 (386,6-2927,5)
19F-DT Form	27	33,3 (16,5-54,0)	8,5 (4,7-15,3)	28	100 (87,7-100)	957,6 (552,8-1659,0)
Prevnar	24	12,5 (2,7-32,4)	8,1 (3,4-19,6)	23	82,6 (61,2-95,0)	380,9 (133,2-1089,5)

[r] A composição das diferentes formulações é fornecida em Tabela 4.

Tabela 12 Porcentagem de sujeitos com concentrações de anticorpo ≥ 0,2 μg/mL, OPA 1:8 e GMCs/GMTs contra pneumococos 19F um mês depois de reforço com 11Pn-PD ou Prevnar em crianças imunizadas com 1μg de 19F-PD, 3μg de 19F-DT ou Prevnar (2μg de 19F-CRM) (Coorte total)

Grupo primário	11 Pn-PD&Di-002					
	Ensaio 22F-ELISA			Ensaio OPA		
	N	% 0,20 (95% de CI)	GMC (μg/nnl) (95% de CI)	N	%>_ 1:8 (95% de CI)	GMT (95% de CI)
11Pn-PD	70	100 (94,9-100)	4,52 (3,7-5,5)	21	100 (83,9-100)	255,6 (135,5-481,9)

19F-DT Form 1[r]	66	98,5 (91,8-100)	3,45 (2,8-4,3)	23	95,7 (78,1-99,9)	374,0 (192,6-726,2)
19F-DT Form 2[r]	70	98,6 (92,3-100)	3,80 (2,9-4,9)	29	96,6 (82,2-99,9)	249,1 (144,7-428,7)
Prevnar	69	97,1 (89,9-99,6)	2,56 (2,0-3,3)	31	96,8 (83,3-99,9)	528,7 (319,4-875,2)

[1-] A composição das diferentes formulações é fornecida em Tabela 4.

Tabela 13 Porcentagem de sujeitos com concentrações de anticorpo ≥ 0,2 μg/mL, OPA 1:8 e GMCs/GMTs contra pneumococos 19A um mês depois de vacinação primária com 1μg de 19F-PD, 3μg de 19F-DT ou Prevnar (2μg de 19F-CRM) (Coorte total)

Grupo	11Pn-PD&DI-001					
	Ensaio 22F-ELISA			Ensaio OPA		
	N	% 0,20 μg/mL (95% de CI)	GMC (95% de CI)	N	% 1:8 (95% de CI)	GMT (95% de CI)
11Pn-PD	45	28,9 (16,4-44,3)	0,09 (0,07-0,11)	52	7,7 (2,1-18,5)	5,2 (4,0-6,8)
19F-DT Form 2[r]	51	29,4 (17,5-43,8)	0,11 (0,08-0,16)	59	27,1 (16,4-40,3)	12,4 (7,6-20,3)
Prevnar	55	18,2 (9,1-30,9)	0,10 (0,08-0,12)	61	3,3 (0,4-11,3)	4,6 (3,8-5,6)

[r] A composição das diferentes formulações é fornecida em Tabela 4

Exemplo 5: Experimentos adjuvantes em modelos pré-clínicos: impacto na imunogenicidade de conjugados de polissacarídeos pneumocócicos de 11 valências em macacos Rhesus idosos

Para otimizar a resposta obtida para vacinas pneumocócicas conjugadas na população idosa, GSK formulou uma vacina conjugada de polissacarídeo (PS) de 11 valências com um novo adjuvante Adjuvante C – veja abaixo.

Grupos de 5 macacos Rhesus idosos (14 a 28 anos de idade) foram imunizados intramuscularmente (IM) em dias 0 e 28 com 500 μl ou de conjugados de PS de 11 valências adsorvidos em 315 μg de AlPO4 ou conjugados de PS de 11 valências misturados com Adjuvante C.

Em ambas as formulações de vacina, os conjugados de PS de 11 valências foram cada compostos dos seguintes conjugados PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14PD, PS18C-PD, PS19F-PD, PS23F-DT e PS6B-DT. A vacina usada foi 1/5 de dose da dose humana da vacina (5 μg de cada sacarídeo por dose humana exceto para 6B [10 μg])

conjugado de acordo com condições de Tabela 6 (Exemplo 4), exceto 19F foi feito de acordo com as seguintes condições de processo CDAP: sacarídeo dimensionado a 9 mg/ml, PD a 5 mg/ml, uma proporção PD/PS inicial de 1,2/1, uma concentração de CDAP de 0,75 mg/mg de PS, pHa=pHc=pHq 9,0/9,0/9,0 e um tempo de acoplamento de 60 min.

Níveis de IgG de ELISA anti-PS e títulos de opsonofagocitose foram dosados em soros coletados em dia 42. Freqüências de célula B de memória anti-PS3 foram medidas por Elispot a partir de células sangüíneas periféricas coletadas em dia 42.

De acordo com os resultados mostrados aqui abaixo, Adjuvante C melhorou significantemente a imunogenicidade de conjugados de PS de 11 valências versus conjugados com AIPO4 em macacos idosos. O novo adjuvante aumentou as respostas de IgG a PS (Figura 1) e os títulos de anticorpo de opsonofagocitose (Tabela 14). Também houve evidência apoiadora de que a freqüência de células B de memória específicas de PS3 é aumentada pelo uso de Adjuvante C (Figura 2).

Tabela 14, Imunogenicidade de conjugado em macacos Rhesus idosos (após-II títulos de opsonofagocitose)

		PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
AIPO4 de 11 valências	Pré-imune	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
	dia 14 após II	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
AdJ-C de 11 valências	Pré-imune	5	9	<8	5	8	37	<B	<8	<8	<8	<8
	dia 14 após II	776	1351	891	676	6208	16384	111	151	7132	2048	<64

Elispot de célula B

O princípio do ensaio recorre ao fato de que células B de memória amadurecem em células plasmáticas in vitro seguindo cultivo com CpG por 5 dias. Células plasmáticas específicas de antígeno geradas in vitro podem ser facilmente detectadas e portanto ser enumeradas usando o ensaio elispot de célula B. O número de células plasmáticas específicas espelha a freqüência de células B de memória no início da cultura.

Resumidamente, células plasmáticas geradas in vitro são

incubadas em placas de cultura revestidas com antígeno. Células plasmáticas específicas de antígeno formam manchas de anticorpo/antígeno, que são detectadas por procedimento imunoenzimático convencional e enumeradas como células B de memória.

No presente estudo, Polissacarídeos foram usados para revestir placas de cultura a fim de enumerar respectivas células B de memória. Resultados são expressos como uma freqüência de células B de memória específicas de PS dentro de um milhão de células B de memória.

O estudo mostra que Adjuvante C pode ser capaz de aliviar o problema conhecido de reforçabilidade de PS3 (veja 5º International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, 2-6 Abril 2006, Alice Springs, Central Australia.

Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book p 245, P010,06).

Exemplo 6, Efetividade de Pneumolisina destoxificada (dPly) como um carreador protéico para aumentar a imunogenicidade de PS 19F em camundongos Balb/c jovens

Grupos de 40 camundongos Balb/c fêmeas (4 semanas de idade) foram imunizados IM em dias 0, 14 e 28 com 50 μl ou de PS simples de 4 valências ou PS conjugado a dPly de 4 valências, ambos misturados com Adjuvante C.

Ambas as formulações de vacina foram compostas de 0,1 μg (quantidade de sacarídeo) de cada dos seguintes PS: PS8, PS12F, PS19F e PS22F.

Níveis de IgG de ELISA anti-PS foram dosados em soros coletados em dia 42.

A resposta de anti-PS19F, mostrada como um exemplo em Figura 3, foi fortemente aumentada em camundongos que receberam

conjugados de dPly de 4 valências comparada com camundongos imunizados com o PS simples. A mesma melhora foi observada para as respostas de IgG anti-PS8, 12F e 22F (dados não mostrados).

Exemplo 7, Efetividade de Proteína D de Tríade de Histidina Pneumocócica (PhtD) como um carreador protéico para aumentar a imunogenicidade de PS 22F em camundongos Balb/c jovens

Grupos de 40 camundongos Balb/c fêmeas (4 semanas de idade) foram imunizados IM em dias 0, 14 e 28 com 50 μl ou de PS simples de 4 valências ou PS conjugado a PhtD de 4 valências, ambos misturados com Adjuvante C.

Ambas as formulações de vacina foram compostas de 0,1 μg (quantidade de sacarídeo) de cada dos seguintes PS: PS8, PS12F, PS19F e PS22F.

Níveis de IgG de ELISA anti-PS foram dosados em soros coletados em dia 42.

A resposta de anti-PS22F, mostrada como um exemplo em Figura 4, foi fortemente aumentada em camundongos que receberam conjugados de PhtD de 4 valências comparada com camundongos imunizados com o PS simples. A mesma melhora foi observada para as respostas de IgG anti-PS8, 12F e 19F IgG (dados não mostrados).

Exemplo 8, Imunogenicidade em camundongos C57BI idosos de conjugados de PS de 13 valências contendo 19A-dPly e 22F-PhtD

Grupos de 30 camundongos C57BI idosos (>69 semanas de idade) foram imunizados IM em dias 0, 14 e 28 com 50 μl ou de conjugados de PS de 11 valências ou conjugados de PS de 13 valências, ambos misturados com Adjuvante C (veja abaixo).

A formilação de vacina de 11 valências foi composta de 0,1 μg de sacarídeo de cada dos seguintes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9VPD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT e

PS23F-PD (veja Tabela 1 e comentário em vacina de 11 valências discutido abaixo de Tabela 2). A formulação de vacina de 13 valências conteve em adição 0,1 μg de PS19A-dPly e conjugados PS22F-PhtD (veja Tabela 1 e comentário em vacina de 13 valências discutido abaixo de Tabela 2 [usando 22F diretamente conjugado]). Em grupo 2 e 4 o carreador de pneumolisina foi destoxificado com tratamento GMBS, em grupo 3 e 5 isto foi feito com formaldeído. Em grupos 2 e 3 PhtD foi usado para conjugar PS 22F, em grupos 4 e 5 uma fusão PhtD_E (a construção VP147 de Patente Internacional 03/054007) foi usada. Em grupo 6 19A foi conjugado a toxóide de difteria e 22F a proteína D.

Níveis de IgG de ELISA anti-PS19A e 22F foram dosados em soros individuais coletados em dia 42.

A reposta de IgG de ELISA IgG gerada para o outro PS foi medida em soros combinados. 19A-dPly e 22F-PhtD administrados dentro da formulação de vacina conjugada de 13 valências foram mostrados imunogênicos em camundongos C57BI idosos (Tabela 15). A resposta imune induzida contra o outro PS não foi negativamente impactada em camundongos que receberam a formulação de 13 valências comparada com aqueles imunizados com a formulação de 11 valências.

Tabela 15. Imunogenicidade de PS em camundongos C57BI idosos (níveis de IgG após-III)

Camundongos negros C57 idosos						
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 0,1µg/50µ1 Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1µg/50µ1 Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1µg/50µ1 Adj C	11V 19A-dPly grabs 22F-PhtD-E 0,1µg/50µ1 Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1µg/50µ1 Adj C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50µ1 Adj C
1 Combinação média	19,30	20,20	24,40	12,80	12,10	13,60
3 Combinação média	6,32	4,84	5,21	6,74	2,38	2,54
4 Combinação média	60,9	67,1	51,4	47,4	45,5	41,1
5 Combinação média	1,34	3,81	3,06	2,75	1,26	1,23
6B Combinação média	4,41	4,12	5,88	1,58	2,31	5,64
7F Combinação média	0,83	0,81	1,65	1,98	0,89	0,99
9V Combinação média	13,8	23,7	20,0	13,1	15,5	9,6
14 Combinação média	25,73	42,96	34,12	32,53	23,97	15,60
18C Combinação média	13,4	20,1	11,9	9,1	8,3	8,4
19F Combinação média	57,5	90,0	63,8	36,5	47,0	69,1
23F Combinação média	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A GMC IC %de soro	0,06 0,04-0,1 33%	0,09 0,05-0,14 47%	0,25 0,15-0,41 83%	0,08 0,06-0,12 53%	0,23 0,14-0,38 80%	0,19 0,09-0,3 73%
22F GMC IC %de soro	NR 0%	5,81 3,2-10,6 97%	3,76 1,8-7,9 90%	0,54 0,3-1,1 77%	0,85 0,4-1,7 87%	2,02 1,2-3,4 97%

Exemplo 9, Imunogenicidade em camundongos Balb/c jovens de conjugados de PS de 13 valências contendo 19A-dPly e 22F-PhtD

Grupos de 30 camundongos Balb/c jovens (4 semanas de idade) foram imunizados IM em dias 0, 14 e 28 com 50 µl ou de conjugados de PS de 11 valências ou conjugados de PS de 13 valências, ambos misturados com Adjuvante C (veja abaixo).

A formulação de vacina de 11 valências foi composta de 0,1 µg de sacarídeo de cada dos seguintes conjugados: 1^{3}51-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9VPD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT e PS23F-PD (veja Tabela 1 e comentário em vacina de 11 valências discutido abaixo de Tabela 2). A formulação de vacina de 13 valências conteve em adição 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly e PS22F-PhtD (veja Tabela 1 e comentário em vacina de 13 valências discutido abaixo de Tabela 2 [usando 22F diretamente conjugado]). Em grupo 2 e 4 o carreador de pneumolisina foi destoxificado com tratamento GMBS, em grupo 3 e 5 isto foi feito com formaldeído. Em grupos 2 e 3 PhtD foi usado para conjugar PS 22F, em grupos 4 e 5 uma fusão PhtD_E (a construção VP147 de Patente Internacional 03/054007) foi usada. Em grupo 6 19A foi conjugado a toxóide de difteria e 22F a proteína D.

Níveis de IgG de ELISA anti-PS19A e 22F foram dosados em soros individuais coletados em dia 42.

A resposta de IgG de ELISA gerada para o outro PS foi medida em soros combinados. 19A-dPly e 22F-PhtD administrados dentro da formulação de vacina conjugada de 13 valências foram mostrados imunogênicos em camundongos Balb/c jovens (Tabela 16). A resposta imune induzida contra o outro PS não foi negativamente impactada em camundongos que receberam a formulação de 13 valências comparada com aqueles imunizados com a formulação de 11 valências.

Tabela 16. Imunogenicidade de PS em camundongos Balb/c jovens (níveis de IgG após-III)

ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 0,1 µg/50µ1 Adj C	**11V** **19A-dPly** **gmbs** **22F-PhtD** 0,1 µg/50µ1 Adj C	**11V** **19A-dPly** **formol** **22F-PhtD** 0,1µg/50µ1 Adj C	**11V** **19A-dPly** **gmbs** **22F-PhtD-E** 0 1µg/50µ1 Adj C	**11V** **19A-dPly** **formol** **22F-PhtD-E** 0,1µg/50µ1 Adj C	**11V** **19A-DT** **22F-PD** 0 1µg/50µ1 Adj C
1 combinação média	131,70	101,20	83,00	82,40	I67,90	85,50
3 combinação média	21,85	10,38	12,53	8,83	8,73	14,98
4 combinação média	147,4	127,0	104,4	95,0	113,6	114,2
5 combinação média	21,38	20,29	18,26	18,95	18,02	23,04
6B combinação média	1,97	4,76	3,72	2,35	1,43	1,05
7F combinação média	7,69	4,58	4,77	4,24	3,92	3,94
9V combinação média	30,1	30,7	26,5	21,4	23,4	28,3
14 combinação média	28,78	27,67	26,23	21,54	24,34	13,73
18C combinação média	53,4	52,37	46,5	57,8	47,8	75,8
19F combinação média	186,6	157,7	169,3	178,9	181,9	223,2
23F combinação média	4,98	3,9	5,11	0,57	3,13	4,57
19A GMC IC % de soro	0,4 0,2-0,6 93%	32,8 26,4-40,7 100%	25,1 20,6-30,6 100%	21,6 17,5-26,7 100%	18,9 15,1-23,5 100%	23,5 19,5-28,5 100%
22F GMC IC % de soro	NR 0%	3,99 1,9-8,42 93%	3,76 1,8-8 100%	6,27 3,8-10,4 100%	8,70 5,4-13,9 100%	18,76 15,2-23,1 100%

Exemplo 10, Imunogenicidade em Porquinhos-da-Índia de conjugados de PS de 13 valências contendo 19A-dPly e 22F-PhtD

Grupos de 20 Porquinhos-da-Índia jovens (Linhagem Hartley; 5 semanas de idade) foram imunizados IM em dias 0, 14 e 28 com 125 µl ou de conjugados de PS de 11 valências ou conjugados de PS de 13 valências, ambos misturados com Adjuvante C (veja abaixo)

A formulação de vacina de 11 valências foi composta de 0,25 µg de sacarídeo de cada dos seguintes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9VPD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT e PS23F-PD (veja Tabela 1 e comentário em vacina de 11 valências discutido

abaixo de Tabela 2). A formulação de vacina de 13 valências conteve em adição 0,1 μg de conjugados PS19A-dPly e PS22F-PhtD (veja Tabela 1 e comentário em vacina de 13 valências discutido abaixo de Tabela 2 [usando 22F diretamente conjugado]). Em grupo 2 e 4 o carreador de pneumolisina foi destoxificado com tratamento GMBS, em grupo 3 e 5 isto foi feito com formaldeído. Em grupos 2 e 3 PhtD foi usado para conjugar PS 22F, em grupos 4 e 5 uma fusão PhtD E (a construção VP147 de Patente Internacional 03/054007) foi usada. Em grupo 6 19A foi conjugado a toxóide de difteria e 22F a proteína D.

Níveis de IgG de ELISA anti-PS19A e 22F foram dosados em soros individuais coletados em dia 42. A resposta de IgG de ELISA gerada para o outro PS foi medida em soros combinados.

Tabela 17, Imunogenicidade de PS em camundongos Balb/c jovens (níveis de IgG após-III)

Porquinhos-da-Índia						
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 0,1μg/50μ1 Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1μg/50μ1 Adj C	11V 19A-d Ply formol 22F-PhtD 0,1μg/50μ1 Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1μg/50μ1 Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1μg/50μ1 Adj C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1μg/50μ1 Adj C
1 Combinação média	78,00	77,21	76,15	68,77	68,59	81,04
3 Combinação média	7,75	9,31	12,73	7,94	4,75	9,59
4 Combinação média	130,7	94,4	132,6	166,8	85,0	101,3
5 Combinação média	109,10	117,10	110,70	158,40	74,10	100,40
6B Combinação média	3,14	4,26	14,4	7,63	6,3	7,52
7F Combinação média	154,2	216,0	240,0	181,0	142,0	179,1
9V Combinação média	90,69	105,45	98,20	93,45	54,12	73,05
14 Combinação média	71,19	77,18	46,53	59,67	38,47	53,69
18C Combinação média	109,4	122,3	137,1	79,9	73,7	83,1

19F	Combinação média	73,9	102,5	112,2	75,5	62,3	72,1
23F	Combinação média	19,19	30,74	29,44	31,52	19,13	24,94
19A	GMC IC % de soro	0,4 0,24-0,68 75%	25,58 12-54,5 100%	41,49 24,4-70,5 100%	14,25 5,9-34,6 100%	27,49 16,6-45,4 100%	6,74 4-11,3 100%
22F	GMC IC % de soro	0,12 0,09-0,16 10%	2,51 0,94-6,73 95%	3,67 1,59-8,42 95%	45,74 29,3-71,4 100%	30,68 17-53,3 100%	96,38 73,5-126,4 100%

Exemplo 11: Formulações sendo feitas e testadas

a) As seguintes formulações são feitas (usando a vacina de 13 valências de tabela 1 e sorotipo 3 de tabela 5 - veja comentário em vacina de 14 valências discutido abaixo de Tabela 2 [usando 22F diretamente conjugado ou através de um ligante de ADH]). Os sacarídeos são formulados com fosfato de alumínio e 3D-MPL como mostrado abaixo.

14V 25ug de MPL Soma de conteúdo de alumínio de BAC > FF Por dose							14V 25ug de MPL Soma de conteúdo de alumínio de BAC > FF Por dose					
PS	carreador	µg de PS	µg de MPL	proporção PS/AI 1/x	µg de Al		PS	carreador	µg de PS	µg de MPL	proporção PS/AI 1/x	µg de Al
I	PD	1		10	10		1	PD	I		10	11)
3	PD	1		10	10		3	PD	1		10	I 0
4	PD	3		10	30		4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10		5	PD	1		10	10
6A	I'D	1		10	10		6A	PD	I		10	10
6B	PD	1		10	10		6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10		7F	PD	I		10	10
9V	PD	1		10	10		9V	PD	I		10	10
14	PD	1		10	10		14	PD	1		10	10
ISC	TT_{A11}	3		15	45		18C	TTAH	3		15	45
19A	dPly	3		10	30		19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30		19F	DT	3		10	30
22F	PhtD	3		10	30		22F	PhtD	3		III	30
23F	PD	1		10	10		23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100		BAC MPL 501200			10	4	40
Conteúdo de FF de alumínio				Soma =	355		Conteúdo de FF de alumínio				Soma -	295

b). A mesma formulação de sacarídeo é adjuvantada com cada dos seguintes adjuvantes:

- Na tabela abaixo a concentração dos componentes de emulsão por dose de 500µ1 é mostrada.

Ingredientes	Adjuvante Al 250µl o/A de emulsão	Adjuvante A2 125µl o/A de emulsão	Adjuvante A3 50µl o/A de emulsão
alfa Tocoferol	11,88mg	5,94mg	2,38mg
Esqualeno	10,7mg	5,35mg	2,14mg
Tween 80	4,85mg	2,43mg	0,97mg

Ingredientes	Adjuvante A4 250µl o/A de emulsão	Adjuvante A5 250µl o/A de emulsão	Adjuvante A6 125µl o/A de emulsão	Adjuvante A7 50µl o/A de emulsão
alfa Tocoferol	11,88mg	11,88mg	5,94mg	2,38mg
Esqualeno	10,7mg	10,7mg	5,35mg	2,14mg
Tween 80	4,85mg	4,85mg	2,43mg	0,97mg
3D-MPL	50µg	25µg	25µg	10µg

c). Os sacarídeos também são formulados com dois adjuvantes baseados em lipossomo:

Composição de Adjuvante B1

Qualitativa Quantitativa (por dose de 0,5 mL)

Lipossomos:

- DOPC 1 mg

- colesterol 0,25 mg

3DMPL 50 µg

QS21 50 µg

KH2PO413.124 mg de Tampão

Na2HPO410,290 mg de Tampão

NaCl 2,922 mg

(100 mM)

WFI q.s. ad 0,5 ml de Solvente

pH 6,1

1. Concentração total de = 50 mM

Composição de Adjuvante B2

Qualitativa Quantitativa (por dose de 0,5 mL)

Lipossomos:

- DOPC 0,5 mg

- colesterol 0,125 mg

3DMPL 25 μg

QS21 25 μg

KH2PO413.124 mg de Tampão

Na2HPO410,290 mg de Tampão NaCl 2.922 mg

(100 mM)

WFI q.s. ad 0,5 ml de Solvente pH 6,1

d) Os sacarídeos também são formulados com Adjuvante C (veja acima para outras composições onde este adjuvante foi usado):

Qualitativa Quantitativa (por dose de 0,5 mL)

Emulsão de óleo em água: 50 μl - esqualeno 2,136 mg

- α-tocoferol 2.372 mg
- - Tween 80 0,97 mg
- colesterol 0,1 mg

3DMPL 50 μg

QS21 50 μg

KH2PO410,470 mg de Tampão

Na2HPO410,219 mg de Tampão

NaCl 4,003 mg

(137 mM)

KCI 0,101 mg

(2,7 mM)

WFI q.s. ad 0,5 ml de Solvente e pH 6,8

Exemplo 12, Impacto de química de conjugação em imunogenicidade de conjugado 22F-PhtD em camundongos Balb/c

Grupos de 30 camundongos Balb/c fêmeas foram imunizados pela via intramuscular (IM) em dias 0, 14 e 28 com formulações de PS de 13 valências contendo PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F e 23F (dose: 0,3 μg de sacarídeo/conjugado para PS 4, 18C, 19A, 19F e 22F e 0,1 μg

de sacarídeo/conjugado para o outro PS).

PS 18C foi conjugado a Toxóide de tétano, 19F a Toxóide de Difteria, 19A a Ply destoxificado com formol, 22F a PhtD e o outro PS a PD.

Duas formulações, constituídas ou de 22F-PhtD preparado por química direta de CDAP ou 22F-AH-PhtD (OS derivado de ADH), foram comparadas. Veja Exemplo 2, Tabela 1 e comentário abaixo de Tabela 2 para características de vacina de 13 valências feita ou com 22F diretamente conjugado ou através de um espaçador de ADH. As formulações de vacina foram suplementadas com adjuvante C.

Níveis de IgG de ELISA anti-PS22F e títulos de opsonofagocitose foram medidos em soros coletados em dia 42.

22F-AH-PhtD mostrou ser muito mais imunogênico do que 22F-PhtD em termos tanto de níveis de IgG (figura 5) e títulos de opsonofagocitose (figura 6).

Exemplo 13. Impacto de novos adjuvantes em imunogenicidade de conjugados de PS de cápsula de Streptoccoccus pneumoniae

Grupos de 40 camundongos Balb/c fêmeas foram imunizados pela via IM em dias 0, 14 e 28 com formulações de PS de 13 valências contendo PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F e 23F (dose: 0,3 μg/conjugado para PS 4, 18C, 19A, 19F e 22F e 0,1 μg/conjugado para o outro PS).

PS 18C foi conjugado a Toxóide de tétano, 19F a Toxóide de Difteria, WA a Ply destoxificada com formol, 22F a PhtD e o outro PS a PD. Veja Exemplo 2, Tabela 1 e comentário abaixo de Tabela 2 para características de vacina de 13 valências feita com 22F diretamente conjugado.

Quatro formulações, suplementadas ou com $AlPO_4$, adjuvante Al, adjuvante A4 ou adjuvante A5, foram comparadas.

Níveis de IgG de ELISA anti-PS, Ply, PhtD e PD IgG foram medidos em soros coletados em dia 42 e combinados por grupo. A proporção seguinte foi calculada para cada antígeno: nível de IgG induzido com o novo adjuvante testado/nível de lgG induzido com AIPO4.

Todos os novos adjuvantes testados melhoraram pelo menos 2 vezes as respostas imunes para conjugados de 13 valências comparados com a formulação clássica de $AlPO_4$ (figura 7).

Exemplo 14, Eficácia protetora de uma combinação PhtD/Ply destoxificada em um modelo pneumocócico de pneumonia de macaco

Grupos de 6 macacos Rhesus (3 a 8 anos de idade), selecionados como aqueles tendo os mais baixos níveis de anticorpo anti-19F pré-existentes, foram imunizados intramuscularmente em dias 0 e 28 ou com conjugados de PS de 11 valências (i.e. 1 μg de PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F, e 3 μg de PS 4, 18C e 19F [de sacarídeo]) ou PhtD (10 μg) + Ply destoxificada com formol (10 μg) ou o adjuvante apenas.

PS 18C foi conjugado a Toxóide de tétano, 19F a Toxóide de Difteria e o outro PS a PD. Veja Exemplo 2, Tabela 1 e comentário abaixo de Tabela 2 para característica de vacina de 11 valências. Todas as formulações foram suplementadas com adjuvante C.

Pneumococos tipo 19F (5.10^8 cfu) foram inoculados no pulmão direito em dia 42. Colônias foram contadas em lavagens bronquioalveolares coletadas em dias 1, 3 e 7 após desafio. Os resultados foram expressos como o número de animais por grupo ou mortos, com pulmão colonizado ou limpo em dia 7 depois de desafio.

Como mostrado em figura 8, uma boa proteção perto de significância estatística (apesar do baixo número de animais usados) foi obtida com conjugados de 11 valências e a combinação PhtD+dPly ($p < 0,12$, teste Exato de Fisher) comparada com o grupo de apenas adjuvante.

Exemplo 15, Impacto de química de conjugação na resposta de anticorpo anti-PhtD e a eficácia protetora contra um desafio tipo 4 induzido por conjugados 22F-PhtD

Grupos de 20 camundongos OF1 fêmeas foram imunizados pela via intramuscular em dias 0 e

14 com 3 μg ou de 22F-PhtD (preparado por química direta de CDAP) ou 22F-AH-PhtD (PS derivado de ADH), ou do adjuvante apenas. Ambos os conjugados 22F monovalentes foram feitos pelos processos de Exemplo 2 (veja também Tabela 1 e Tabela 2). Cada formulação foi suplementada com adjuvante C.

Níveis de IgG de ELISA anti-PhtD foram medidos em soros coletados em dia 27.

Camundongos foram desafiados intranasalmente com 5.10^6 cfu de pneumococos tipo 4 em dia 28 (i.e. um sorotipo pneumocócico não potencialmente coberto pelo PS presente na formulação de vacina testada). A mortalidade induzida foi monitorada até dia 8 após desafio.

22F-AH-PhtD induziu uma resposta de IgG anti-PhtD significantemente maior e melhor proteção contra desafio tipo 4 do que 22F-PhtD.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de compreender conjugados de sacarídeo capsular de *S. pneumoniae* de sorotipos 19A e 19F, em que 19A é conjugado a um primeiro toxóide bacteriano, que é pneumolisina, toxóide de difteria ou CRM197, e 19F é conjugado a um segundo toxóide bacteriano, que é toxóide de difteria ou CRM197, e compreende ainda conjugados de sacarídeos capsulares 4, 6B, 9V, 14, 18C e 23F, 1, 5 e 7F de *S. pneumoniae*, em que o tamanho médio do sacarídeo 19A está entre 110 e 700kDa.

2. Composição imunogênica de acordo com reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreender ainda um conjugado de sacarídeo capsulare 22F de *S. pneumoniae*.

3. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o tamanho médio do sacarídeo 19A está entre 110 a 300, 120 a 200, 130 a 180 ou 140 a 160 kDa.

4. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o sacarídeo 19A foi dimensionado por um fator de não mais que x5.

5. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizada pelo fato o sacarídeo 19A foi dimensionado por microfluidização.

6. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o tamanho médio dos sacarídeos é acima de 50 kDa.

7. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que compreende o sorotipo 1 possuindo um tamanho médio de sacarídeo entre 300 e 400 kDa.

8. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que compreende o sorotipo 5 possuindo um

tamanho médio de sacarídeo entre 350 e 450 kDa.

9. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, caracterizada pelo fato de que compreende o sorotipo 7F possuindo um tamanho médio de sacarídeo entre 200 e 300 kDa.

10. Vacina, caracterizada pelo fato de compreender a composição imunogênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

11. Processo para preparar a vacina como definida na reivindicação 10, caracterizado pelo fato de compreender a etapa de misturar a composição imunogênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 com um excipiente farmaceuticamente aceitável.

12. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de ser para uso no tratamento ou prevenção de uma doença causada por infecção por *Streptococcus pneumoniae*.

13. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de a doença é uma ou ambas de pneumonia ou doença pneumocócica invasiva (IPD) de humanos idosos, exacerbações da doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) de humanos idosos, otite média de humanos infantis, meningite e/ou bacteriemia de humanos infantis, ou pneumonia e/ou conjuntivite de humanos infantis.

14. Vacina de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de ser para uso no tratamento ou prevenção de uma doença causada por infecção por *Streptococcus pneumoniae*.

15. Vacina de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de a doença é uma ou ambas de pneumonia ou doença pneumocócica invasiva (IPD) de humanos idosos, exacerbações da doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) de humanos idosos, otite média de humanos infantis, meningite e/ou bacteriemia de humanos infantis, ou

pneumonia e/ou conjuntivite de humanos infantis.

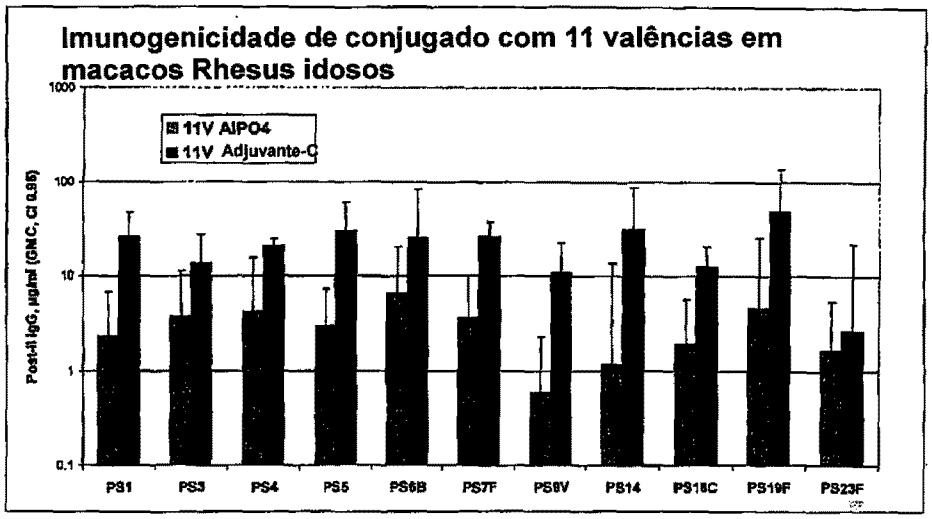

Figura 1, Imunogenicidade de conjugado em macacos Rhesus idosos (níveis de IgG anti-PS após II)

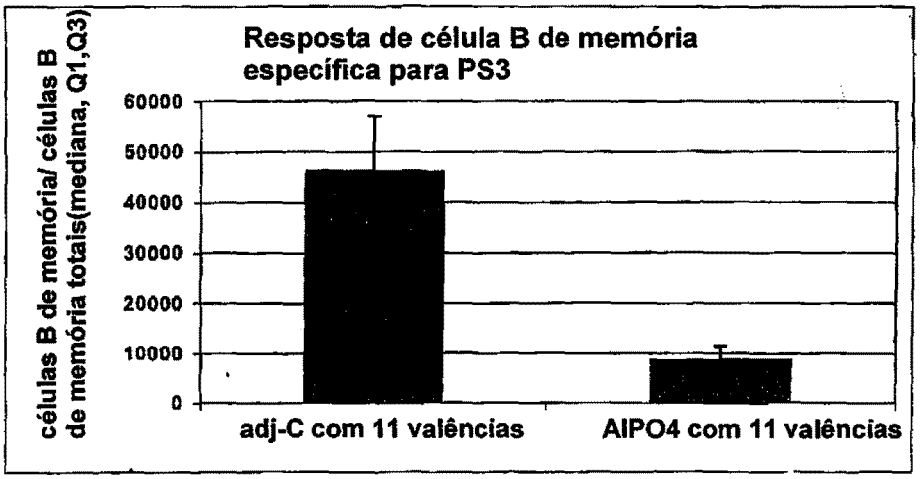

Figura 2, Imunogenicidade de conjugado em macacos Rhesus idosos (freqüências de células B de memória anti-PS3 após II)

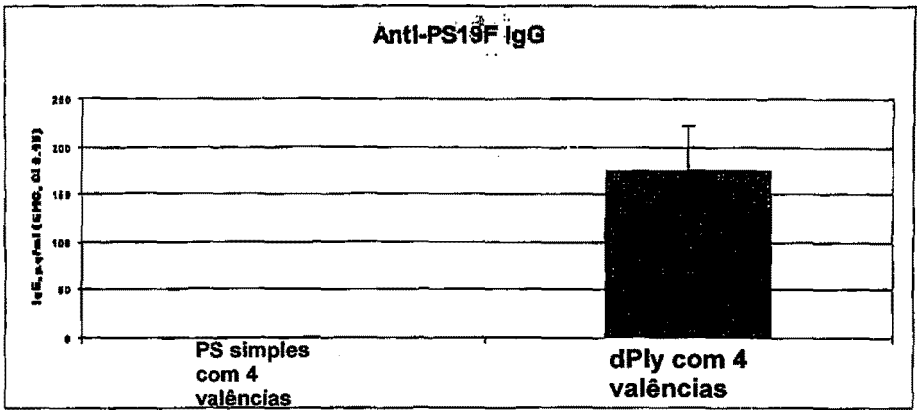

Figura 3, Imunogenicidade de PS19F em camundongos Balb/c (níveis de IgG após III)

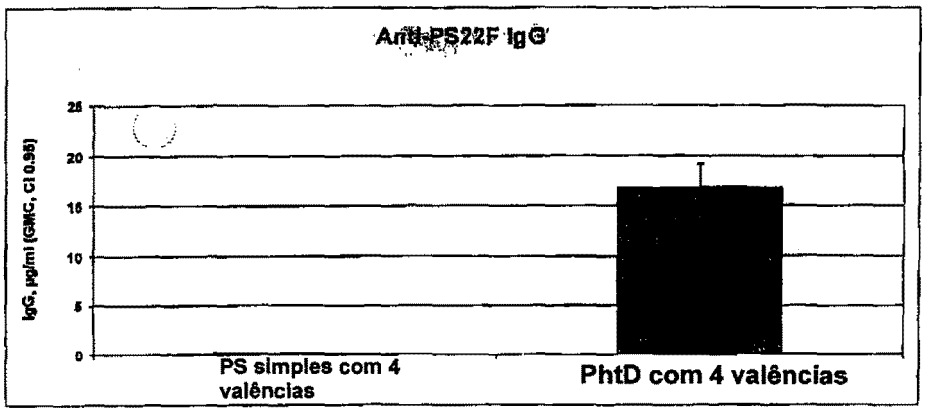

Figura 4, Imunogenicidade de PS22F em camundongos Balb/c (níveis de IgG após III)

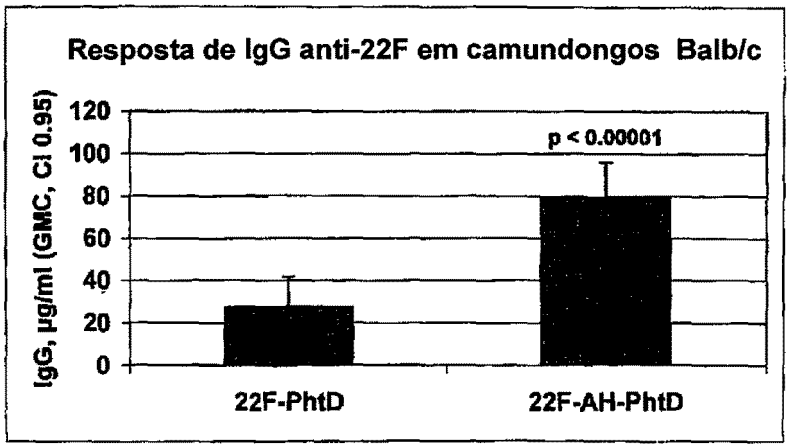

Figura 5, níveis no soro de anticorpo IgG anti-PS

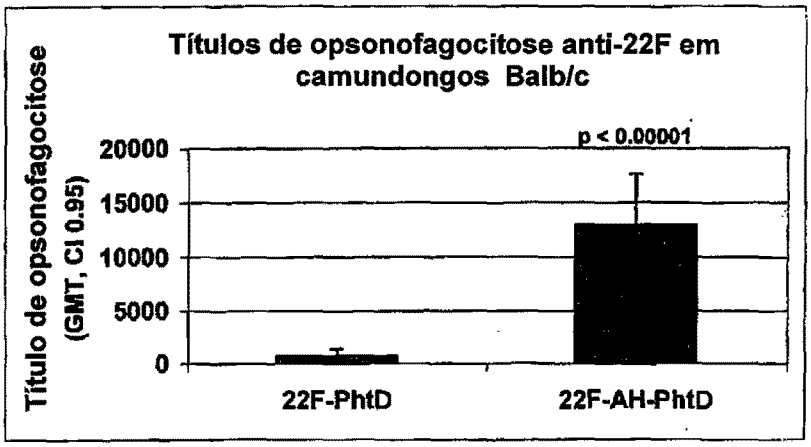

Figura 6, títulos de opsonofagocitose

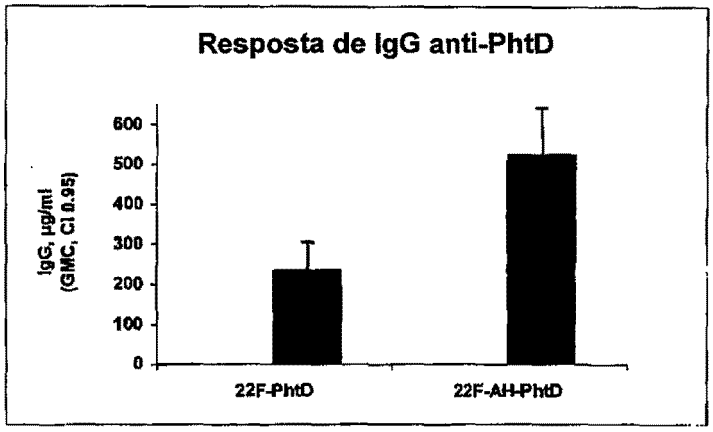

Figura 9, resposta no soro de IgG anti-PhtD

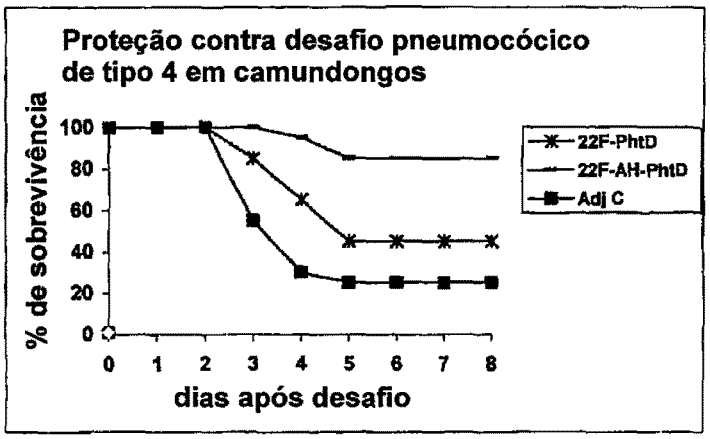

Figura 10, Proteção contra desafio pneumocócico de tipo 4 em camundongos

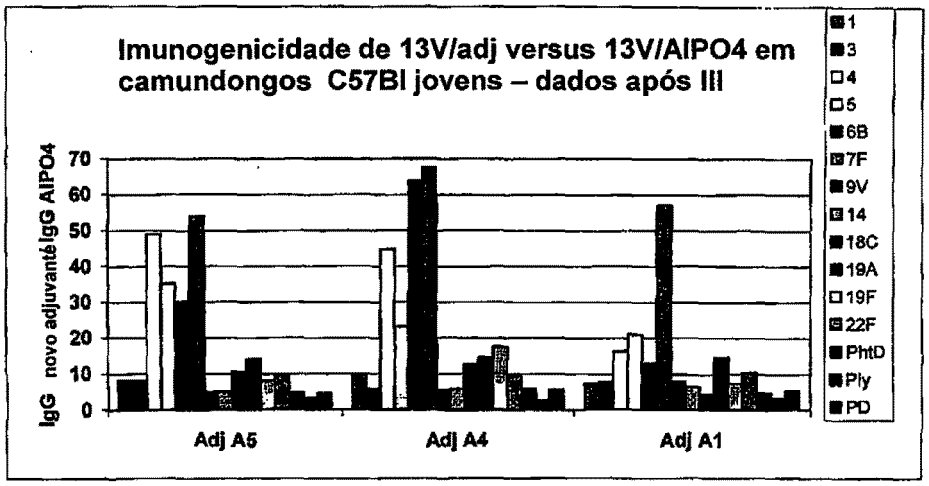

Figura 7, comparação de respostas de IgG induzidas com novos adjuvantes com a resposta obtida com AlPO4

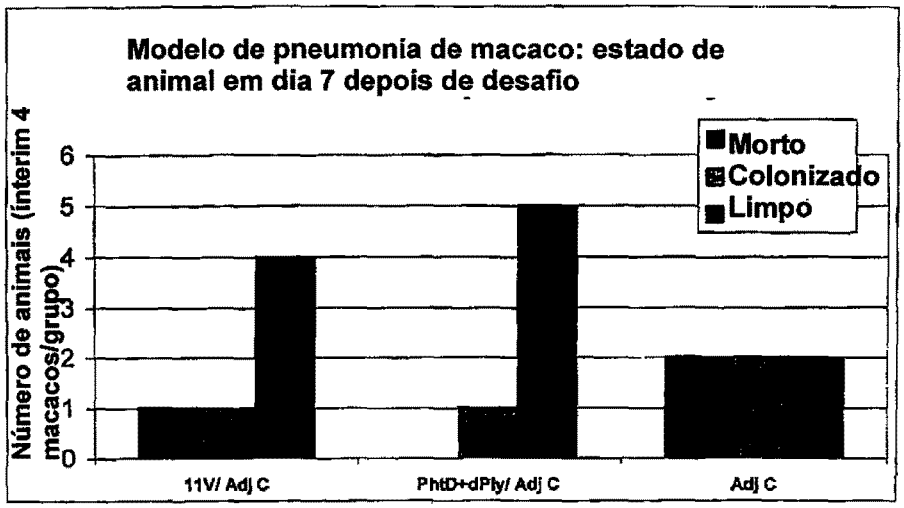

Figura 8, eficácia protetora de combinação protéica PhtD + dPly contra colonização de pulmão de tipo 19F em macacos Rhesus

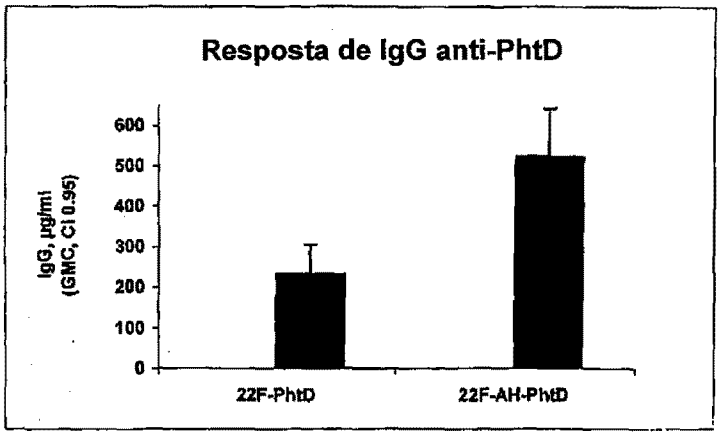

Figura 9, resposta no soro de IgG anti-PhtD

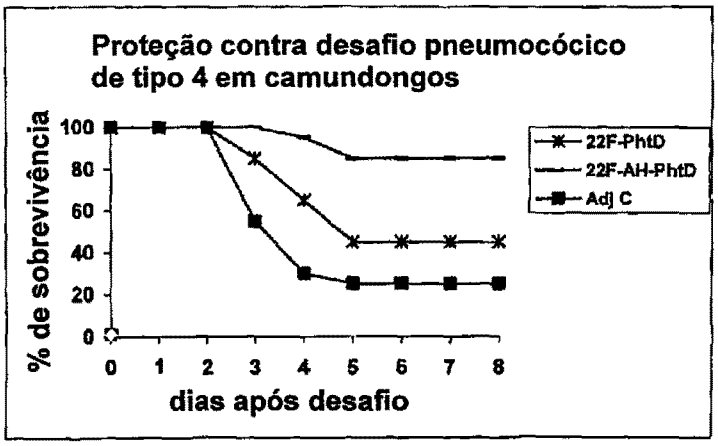

Figura 10, Proteção contra desafio pneumocócico de tipo 4 em camundongos