(11) Número de Publicação: **PT 2303333 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 47/48 (2015.01) ***A61P 43/00*** (2015.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2009.06.12**

(30) Prioridade(s): **2008.06.13 GB 0810894**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.04.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.02.18**
110/2015

(73) Titular(es):
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
RUE DE L`INSTITUT 89 1330 RIXENSART BE

(72) Inventor(es):
PAOLO COSTANTINO IT
FRANCESCO BERTI IT
FRANCESCA MICOLI IT

(74) Mandatário:
ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **SACÁRIDOS DE VI CONJUGADOS**

(57) Resumo:
PREPARARAM-SE DOIS CONJUGADOS VI POR SÍNTESE MEDIADA POR CARBODIIMIDA, UTILIZANDO CRM197 DERIVATIZADO DE DI-HIDRAZIDA DO ÁCIDO ADÍPICO (UMA VARIANTE NÃO TÓXICA DE TOXINA DE DIFTERIA) E TOXÓIDE DE TÉTANO COMO PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS.

RESUMO

"SACÁRIDOS DE VI CONJUGADOS"

Prepararam-se dois conjugados Vi por síntese mediada por carbodiimida, utilizando CRM197 derivatizado de di-hidrazida do ácido adípico (uma variante não tóxica de toxina de difteria) e toxóide de tétano como proteínas transportadoras.

DESCRIÇÃO

"SACÁRIDOS DE VI CONJUGADOS"

CAMPO TÉCNICO

A invenção refere-se a vacinas, de um modo mais particular, as contra a febre tifóide.

TÉCNICA ANTERIOR

A febre tifóide é uma doença grave comum em muitas partes do mundo. O polissacárido capsular purificado de *Salmonella typhi* (Vi) é utilizado como vacina, proporcionando cerca de 70% de protecção contra a febre tifóide em indivíduos de 5 a 45 anos de idade. No entanto, a vacina não é susceptível de estabelecer memória imunológica e é ineficaz em bebés ou crianças [1]. Uma vacina conjugada de Vi acoplada a exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* mutante recombinante (Vi-*r*EPA) obteve uma resposta mais reforçada em crianças jovens e foi altamente eficaz [2].

O documento WO 02/20059 A2 divulga um método para a produção de um conjugado de polissacárido capsular purificado de salmonella typhi, em que uma fracção purificada da proteína transportadora de albumina de soro de galinha é simultaneamente combinada com a carbodiimida EDC e o ligante ADH, seguido por remoção do ligante em excesso por meio de diálise.

Lillo (2003) *Carbohydrate Polymers* 51(3):317-325 divulga que a oxidação de poli-α-D-galactosamina com óxidos de azoto produz um derivado que é semelhante ao polissacárido Vi antigénico de *Salmonella typhi*.

É um objectivo da invenção proporcionar novos processos para a produção de vacinas de conjugado Vi que podem ser empregues numa escala industrial.

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

A requerente concebeu um novo método para o fabrico de conjugados Vi e produziu também um novo conjugado compreendendo Vi acoplado a CRM_{197} de acordo com as reivindicações.

Um primeiro aspecto da divulgação proporciona um método para a preparação de um conjugado Vi. Um ligante, tal como di-hidrazida do ácido adípico (ADH) e uma carbodiimida, tal como 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), são simultaneamente adicionados a uma solução contendo uma proteína transportadora, tal como CRM_{197} ou toxóide de tétano (TT), para obter uma proteína transportadora derivatizada.

Um tampão, tal como ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico (MES), pode ser adicionado à solução contendo a proteína transportadora antes da adição de ADH e EDAC. A razão em peso da carbodiimida para a proteína é, tipicamente, 0,1 a 0,15, uma vez que razões carbodiimida/proteína superiores podem provocar a formação de agregados.

Seguindo a derivatização da proteína transportadora, qualquer ligante em excesso (*e. g.*, ADH) é removido, por exemplo, por diálise ou filtração de fluxo tangencial (TFF).

Vi é também activado com uma carbodiimida e é subsequentemente combinado com a proteína transportadora derivatizada. Para activação de Vi, podem ser utilizadas várias razões de Vi e carbodiimida. Pode ser utilizada uma razão molar 1:1 (grupos COOH de Vi para carbodiimida), mas para reduzir a quantidade de derivados de carbodiimida não conjugados residual (*e. g.*, ureias tal como EDU; N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)ureia, um produto reaccional solúvel de acoplamento de EDAC) podem ser utilizadas razões superiores *i. e.* com um excesso molar de Vi *e. g.*, >1,5:1 e, idealmente, ≥3:1, tal como 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 ou superiores. Podem ser utilizadas razões até 200:1. Estas razões são superiores às utilizadas na referência 3. A activação de Vi pode ser realizada à temperatura ambiente *e. g.*, em cerca de 2 minutos.

Deste modo, o método compreende os passos de:

a) Simultanamente combinar um ligante, uma carbodiimida e uma proteína transportadora.
b) Fazer reagir Vi com uma carbodiimida
c) Fazer reagir o produto do passo a) com p produto do passo b).

Os passos a) e b) podem ser realizados em qualquer ordem.

Após o passo a), mas antes do passo c), qualquer ligante em excesso pode ser removido.

Este aspecto da divulgação também proporciona um método para a preparação de um conjugado Vi-CRM_{197}, em que Vi é combinado com CRM_{197} derivatizado. O método compreende os passos de:

a) Fazer reagir Vi com uma carbodiimida
b) Fazer reagir o produto do passo a) com CRM_{197} derivatizado.

Este aspecto da divulgação também proporciona um método para a preparação de um conjugado Vi-CRM_{197}, compreendendo o passo de:

a) Fazer reagir Vi activado com CRM_{197} derivatizado.

A referência 3 descreve um processo para a preparação de conjugados de Vi com *r*EPA e albumina de soro bovino (BSA) por síntese mediada por carbodiimida com ADH como ligante. No entanto, este processo não envolve a combinação simultânea de *r*EPA/BSA, ADH e EDAC. EM vez disso, *r*EPA/BSA e ADH são combinados e misturados antes da adição de EDAC.

Um segundo aspecto da divulgação proporciona um conjugado Vi-CRM_{197}. Este conjugado pode ser preparado pelo método acima ou pode ser obtido por outros meios.

Sacárido Vi

Vi é o sacárido capsular de *Salmonella typhi* (anteriormente classificado como espécie própria, mas agora referido como o

serotipo *typhi de S.enterica).* Vi pode também ser encontrado noutros serotipos de *Salmonella* (tal como *S.enterica* serotipo *paratyphi* C ou serotipo *dublin*) e noutras bactérias, tal como *Citrobacter (e. g., C.freundii* e *C.youngae*). O polissacárido Vi é um homopolímero linear de um ácido hexosaminourónico, ácido α1,4-*N*-acetilgalactos-aminourónico, que é 60-90% acetilado na posição C-3 [4-9]. A substituição O-acetilo em Vi é um factor na sua capacidade para induzir uma resposta imunitária protectora [10]. A imunogenicidade de Vi está estreitamente relacionada com o seu grau de O-acetilação. A O-desacetilação parcial pode aumentar ligeiramente a imunogenicidade; a O-desacetilação completa elimina a imunogenicidade de Vi [11].

O sacárido Vi utilizado na presente invenção pode ser quimicamente modificado em relação ao sacárido capsular como encontrado na natureza. Por exemplo, o sacárido Vi pode ser parcialmente O-desacetilado, N-desacetilado (parcial ou totalmente), N-propionado (parcial ou totalmente), *etc.* A desacetilação pode ocorrer antes, durante ou após conjugação, mas, de um modo preferido, ocorre antes da conjugação. O efeito de desacetilação *etc.* pode ser avaliado por ensaios de rotina.

O sacárido Vi pode ser hidrolisado para formar polissacáridos encurtados (*e. g.,* com um grau de polimerização (DP) de, pelo menos, 10, *e. g.,* 20, 30, 40, 50, 60 ou mais) ou oligossacáridos *(e. g.,* com um grau de polimerização de 2 a 10). Os oligossacáridos são preferidos aos polissacáridos para utilização em vacinas. O grau de polimerização médio pode, convenientemente, ser medido por cromatografia de troca iónica ou por ensaios colorimétricos [12].

Além disso, verificou-se por imunodifusão dupla que a pectina, quando O-acetilada a C-2 e C-3, é antigenicamente idêntica a Vi. A estrutura de Vi difere da da pectina uma vez que este é N-acetilado em C-2 e O-acetilado em C-3. A pectina O-acetilada conjugada a toxóide de tétano induziu anticorpos Vi em ratinhos e nova injecção induziu uma resposta mais reforçada [13, 14]. Como consequência, pode ser utilizada pectina O-acetilada na invenção em vez de Vi. No entanto, conjugados Vi mostraram ser significativamente mais imunogénicos do que os seus análogos de pectina O-acetilada e, assim, é preferido Vi de fontes naturais [13]. No entanto, será entendido que referências a "Vi" podem incluir "pectina O-acetilada" e quaisquer outras moléculas que possam ser estrutural ou antigenicamente idênticas a Vi e sejam susceptíveis de induzir anticorpos que reconheçam Vi nativo.

"Vi" pode referir-se a um polissacárido Vi (*e. g.*, com um grau de polimerização de, pelo menos, 10, *e. g.*, 20, 30, 40, 50, 60 ou mais) ou um oligossacárido Vi (*e. g.*, com um grau de polimerização de 2 a 10) e podem ter sido quimicamente modificados. Os oligossacáridos podem ser o resultado de despolimerização e/ou hidrólise de um polissacárido progenitor.

Purificação de Vi

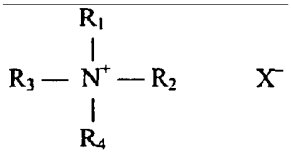
Os sacáridos capsulares podem ser purificados por técnicas conhecidas, como descrito nas referências abaixo. Um processo típico envolve extracção básica, centrifugação, filtração, tratamento de RNase/DNase, tratamento de protease, concentração, cromatografia de exclusão por tamanho, ultrafiltração, cromatografia de troca aniónica e ultrafiltração adicional.

Um método particularmente útil é divulgado na referência 15.

Um processo para a purificação de Vi pode compreender os passos de (a) precipitação de Vi, seguida por (b) solubilização do precipitado Vi utilizando um álcool, tal como etanol.

Precipitação e solubilização de álcool

São conhecidas na técnica várias técnicas para a precipitação de polissacáridos solúveis, tal como Vi. Os métodos preferidos utilizam um ou mais detergentes catiónicos. Os detergentes, de um modo preferido, possuem a seguinte fórmula geral:



em que: R_1, R_2 e R_3 são iguais ou diferentes e cada um significa alquilo ou arilo; ou R_1 e R_2 em conjunto com o átomo de azoto ao qual estes são ligados formam um anel heterocíclico saturado com 5 ou 6 membros e R_3 significa alquilo ou arilo; ou R_1, R_2 e R_3 em conjunto com o átomo de azoto ao qual estes são ligados formam um anel heterocíclico com 5 ou 6 membros, insaturado no átomo de azoto,

R_4 significa alquilo ou arilo, e

X^- significa um anião.

Os detergentes particularmente preferidos para utilização no método são sais de tetrabutilamónio e cetiltrimetilamónio (*e. g.*, os sais brometo). É particularmente preferido brometo de cetiltrimetilamónio ("CTAB") [16]. O CTAB é também conhecido como brometo de hexadeciltrimetilamónio, brometo de cetrimónio, Cetavlon e Centimide. Outros detergentes incluem brometo de hexadimetrina e sais de miristiltrimetilamónio.

Vi pode ser libertado para o meio durante o cultivo. Como consequência, o material de partida para precipitação será, tipicamente, o sobrenadante de um cultivo bacteriano centrifugado ou será um cultivo concentrado. Este material pode ser filtrado para remover a turbidez.

O passo de precipitação pode ser selectivo para Vi, mas, também co-precipitarão, tipicamente, outros co-componentes *(e. g.*, proteínas, ácido nucleico *etc.)*.

O Vi precipitado pode ser recolhido por centrifugação antes da solubilização.

Após precipitação, Vi (tipicamente na forma de um complexo com o detergente catiónico) é re-solubilizado. É preferido utilizar um solvente que seja relativamente selectivo para Vi de modo a minimizar contaminantes *(e. g.*, proteínas, ácido nucleico *etc.)*. Verificou-se que o etanol é vantajoso a este respeito e é altamente selectivo para o complexo CTAB-Vi. Podem ser utilizados outros álcoois inferiores *(e. g.*, metanol, propano-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dióis *etc.*)

O álcool é, de um modo preferido, adicionado ao Vi precipitado para obter uma concentração de álcool final (com base no teor total de álcool e água) de entre 50% e 99% (*e. g.*, em torno de 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% ou em torno de 90%) e, de um modo preferido, entre 75% e 95%.

O álcool pode ser adicionado ao precipitado Vi em forma pura ou pode ser adicionado numa forma diluída com um solvente miscível (*e. g.*, água). As misturas de solventes preferidas são misturas álcool:água, com uma razão preferida entre em torno de 70:30 e em torno de 95:5 (*e. g.*, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

Em comparação com processos convencionais para a preparação de polissacáridos capsulares, o processo de dois passos de precipitação seguido por extracção alcoólica é mais rápido e simples.

Ao contrário do processo descrito na ref. 17, o processo utiliza detergente catiónico em vez de detergente aniónico. Ao contrário do processo da ref. 18, a precipitação não requer um suporte poroso inerte. Além disso, ao contrário dos processos da técnica anterior, é utilizado um álcool para re-solubilizar Vi em vez de precipitá-lo.

Processamento adicional do polissacárido solubilizado

Após re-solubilização, Vi é ainda tratado para remover contaminantes porque, na produção de vacinas humanas, mesmo uma contaminação menor não é aceitável.

Este tratamento pode incluir centrifugação do complexo CTAB-Vi solubilizado, seguido por precipitação de Vi a partir do sobrenadante obtido por catiões de troca (*e. g.*, pela adição de sais de cálcio ou sódio) para obter um precipitado Vi que é insolúvel em álcool mas solúvel em água.

Este precipitado pode ser recolhido por centrifugação e ainda lavado em álcool e re-solubilizado numa solução aquosa, se desejado.

O processo de tratamento também envolverá, tipicamente, um ou mais passos de filtração.

Pode ser utilizada filtração em profundidade. Esta é particularmente útil para clarificação.

Pode ser utilizada filtração através de carvão activado. Esta é útil para remover pigmentos e compostos orgânicos vestigiais. Pode ser repetida até, por exemplo, OD_{275nm}<0,2.

Pode ser utilizada filtração de tamanho ou ultrafiltração.

Se Vi for hidrolisado, o hidrolisado será, de um modo geral, dimensionado de modo a remover oligossacáridos de comprimento curto. Isto pode ser conseguido de vários modos, tais como ultrafiltração seguida por cromatografia de troca iónica.

A invenção não está limitada a sacáridos purificados de fontes naturais, no entanto, e os sacáridos podem ser obtidos por outros métodos, tais como síntese total ou parcial.

Conjugados

Vi puro é um imunogénio fraco. Para eficácia protectora, portanto, Vi pode ser apresentado ao sistema imunitário como um conjugado Vi-veículo. É bem conhecida a utilização de conjugação a proteínas transportadoras de modo a melhorar a imunogenicidade de antigénios de hidratos de carbono [*e. g.*, revisto nas ref. 19 a 27 *etc.*] e é utilizada, em particular, para vacinas pediátricas [28]. Como descrito acima, um sacárido pode ser conjugado a uma proteína transportadora ou a uma mistura de diferentes proteínas transportadoras. De modo semelhante, uma proteína transportadora pode transportar um sacárido ou uma mistura de diferentes sacáridos, *i. e.*, múltiplos sacáridos diferentes [29].

A invenção proporciona um conjugado de (i) Vi e (ii) CRM_{197} como uma proteína transportadora.

O CRM_{197} pode ser covalentemente conjugado a Vi directamente ou por meio de um ligante.

Pode ser utilizada qualquer reacção de conjugação adequada, com qualquer ligante adequado se necessário. Os oligossacáridos serão, tipicamente, dimensionados antes da conjugação. Quando a composição da invenção inclui um sacárido despolimerizado, é preferido que a despolimerização preceda a conjugação.

A ligação de Vi a CRM_{197} é, de um modo preferido, por meio de um grupo $-NH_2$ *e. g.*, na cadeia secundária de um resíduo de lisina em CRM_{197}, ou de um resíduo de arginina. A ligação a CRM_{197} pode também ser por meio de um grupo -SH *e. g.*, na cadeia

secundária de um de resíduo de cisteína. Em alternativa, Vi pode ser ligado a CRM_{197} por meio de uma molécula ligante como descrito abaixo.

Vi será, tipicamente, activado ou funcionalizado antes da conjugação. Uma técnica preferida utiliza carbodiimidas (*e. g.*, 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC)). Outras técnicas adequadas utilizam hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzóico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDAC, TSTU (ver também a introdução à referência 30).

As ligações por meio de um grupo ligante a proteínas transportadoras, em geral, podem ser feitas utilizando qualquer processo conhecido, por exemplo, os processos descritos nas referências 31 e 32. Um tipo útil de ligação é um ligante de ácido adípico, que pode ser formado acoplando um grupo $-NH_2$ livre (*e. g.*, introduzido a Vi por aminação) com ácido adípico (utilizando, por exemplo, activação de diimida) e depois acoplando uma proteína ao intermediário sacárido-ácido adípico resultante [23, 33, 34]. Outro tipo útil de ligação é um ligante carbonilo, que pode ser formado por reacção de um grupo hidroxilo livre de um Vi modificado com CDI [35, 36] seguido por reacção com uma proteína para formar uma ligação carbamato. Um ligante útil é di-hidrazida do ácido adípico ADH [37]. A proteína transportadora pode ser derivatizada com ADH (por exemplo, por acoplamento de carbodiimida a um grupo lateral de ácido carboxílico) e subsequentemente ligado a Vi [3] (novamente, por exemplo, por acoplamento de carbodiimida). Outros ligantes incluem β-propionamida [38], nitrofenil-etilamina [39], halogenetos de halo-acilo [40], ligações glicosídicas [41], ácido 6-aminocapróico [42], N-succinimidil-3-

(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [43], unidades C_4 a C_{12} [44], *etc.* Pode também ser utilizada condensação de carbodiimida [45].

Um processo útil para ligar Vi a CRM_{197} envolve a tiolação de Vi com cistamina ou cisteamina (acoplamento de carbodiimida) e subsequente reacção com CRM_{197} derivatizado com SPDP [46].

Outro processo útil envolve a introdução de grupos amina em Vi seguido por derivatização com um diéster adípico (*e. g.*, diéster N-hidroxisuccinimido de ácido adípico) e reacção com CRM_{197}.

Um ligante bifuncional pode ser utilizado para proporcionar um primeiro grupo para acoplamento a um grupo amina que foi introduzido em Vi e um segundo grupo para acoplamento ao veículo (tipicamente, para acoplamento a uma amina no veículo).

O primeiro grupo no ligante bifuncional é, deste modo, susceptível de reagir com um grupo amina ($-NH_2$) em Vi. Esta reacção envolverá, tipicamente, uma substituição electrofílica do hidrogénio da amina. O segundo grupo no ligante bifuncional é susceptível de reagir com um grupo amina no veículo. Esta reacção envolverá, novamente, tipicamente, uma substituição electrofílica da amina.

Quando as reacções com Vi e a proteína transportadora envolvem aminas então é preferido utilizar um ligante bifuncional, por exemplo, um ligante homobifuncional da fórmula X-L-X, em que: os dois grupos X são iguais entre si e podem reagir com as aminas; e em que L é uma unidade ligante no ligante. Um grupo X útil é N-oxisuccinimida. L pode possuir fórmula $L'-L^2-L'$, em que L' é carbonilo. Os grupos L^2 úteis são

alquilos de cadeia linear com 1 a 10 átomos de carbono (*e. g.*, C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}) *e. g.*, $-(CH_2)_4-$.

Outros grupos X são os que formam ésteres quando combinados com HO-L-OH, tais como norborano, ácido p-nitrobenzóico e sulfo-N-hidroxisuccinimida.

Os ligantes bifuncionais adicionais para utilização com a invenção incluem halogenetos de acriloílo (*e. g.*, cloreto) e halogenetos de halo-acilo.

O ligante será, de um modo geral, adicionado em excesso molar a Vi modificado.

As proteínas transportadoras preferidas são toxinas bacterianas, tais como toxinas de difteria ou tétano ou toxóides ou os seus mutantes. Estes são normalmente utilizados em vacinas conjugadas. É particularmente preferido o mutante de toxina de difteria CRM_{197} [47].

Outras proteínas transportadoras adequadas incluem o complexo de proteína de membrana exterior *N.meningitidis* [48], péptidos sintéticos [49, 50], proteínas de choque térmico [51, 52], proteínas de tosse convulsa [53, 54], citocinas [55], linfocinas [55], hormonas [55], factores de crescimento [55], proteínas artificiais compreendendo múltiplos epítopos de células T $CD4^+$ humanas de vários antigénios derivados de patogénios [56] tais como N19 [57], proteína D de *H.influenzae* [58-60], pneumolisina [61] ou seus derivados não tóxicos [62], proteína de superfície pneumocócica PspA [63], proteínas captadoras de ferro [64], toxina A ou B de *C.difficile* [65], exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante

(*r*EPA) [66], *etc.* É possível utilizar misturas de proteínas transportadoras. Uma única proteína transportadora pode transportar vários sacáridos Vi [67].

Os conjugados podem possuir proteína transportadora em excesso (p/p) ou Vi em excesso (p/p) *e. g.*, na gama de razão de 1:5 a 5:1. Os conjugados com proteína transportadora em excesso são típicos *e. g.*, na gama de 0,2:1 a 0,9:1, tal como 0,5:1, ou com pesos iguais (1:1). Em algumas formas de realização, a razão Vi:proteína está entre 0,4:1 e 1,2:1.

Quando o conjugado forma o componente Vi numa composição imunogénica da invenção, a composição pode também compreender proteína transportadora livre [68].

A unidade Vi no conjugado é, de um modo preferido, um polissacárido ou um oligossacárido Vi de baixo peso molecular, como definido acima. Os oligossacáridos serão, tipicamente, dimensionados antes da conjugação.

O conjugado proteína-Vi é, de um modo preferido, solúvel em água e/ou num tampão fisiológico.

Composições farmacêuticas

A invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo (a) conjugado Vi e (b) um veículo farmaceuticamente aceitável. Uma discussão completa desses veículos está disponível na ref. 69.

As infecções microbianas afectam várias áreas do corpo e, assim, as composições da invenção podem ser preparadas em várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injectáveis, como soluções líquidas ou suspensões. Podem também ser preparadas formas sólidas adequadas para solução ou suspensão, em veículos líquidos antes da injecção. A composição pode ser preparada para administração tópica *e. g.*, como unguento, creme ou pó. A composição pode ser preparada para administração oral *e. g.*, como um comprimido ou cápsula ou como xarope (opcionalmente aromatizado). A composição pode ser preparada para administração pulmonar *e. g.*, como um inalador, utilizando um pó fino ou um pulverizador. A composição pode ser preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, aural ou ocular *e. g.*, como gotas, como um pulverizador ou como um pó [*e. g.*, 70]. A composição pode ser incluída num desinfectante bucal. A composição pode ser liofilizada.

A composição farmacêutica é, de um modo preferido, estéril. É, de um modo preferido, livre de pirogénio. É, de um modo preferido, tamponada *e. g.*, entre pH 6 e pH 8, de um modo geral, em torno de pH 7.

Uma composição da invenção pode compreender um conjugado Vi e soro fisiológico.

A invenção também proporciona um dispositivo de distribuição contendo uma composição farmacêutica da invenção. O dispositivo pode ser, por exemplo, uma seringa ou um inalador.

As composições farmacêuticas da invenção são, de um modo preferido, composições imunogénicas, em que estas compreendem

uma quantidade imunologicamente eficaz de imunogénio Vi. Por "quantidade imunologicamente eficaz", entende-se que a administração dessa quantidade a um indivíduo, numa dose única ou como parte de uma série, é eficaz para tratamento ou prevenção. Esta quantidade varia dependendo da saúde e condição física do indivíduo a tratar, idade, do grupo taxonómico do indivíduo a tratar *(e. g.,* primata não humano, primata, *etc.),* da capacidade do sistema imunitário do indivíduo para sintetizar anticorpos, do grau de protecção desejado, da formulação da vacina, da avaliação do médico que trata da situação médica e outros factores relevantes. Espera-se que a quantidade cairá numa gama relativamente ampla que pode ser determinada através de ensaios de rotina. Espera-se uma dose entre 1 µg e 20 µg de sacárido *e. g.,* cerca de 5 µg/dose. O tratamento de dosagem pode ser um esquema de dose única ou um esquema de dose múltipla (*e. g.,* incluindo doses mais reforçadas). A composição pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunoreguladores.

Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas directamente ao indivíduo. Os indivíduos a tratar podem ser animais; em particular, podem ser tratados indivíduos humanos.

As composições imunogénicas da invenção podem ser utilizadas terapeuticamente (*i. e.* para tratar uma infecção existente) ou profilaticamente (*i. e.* para prevenir infecção futura).

Uma composição imunogénica pode ser não adjuvada. Noutras formas de realização, contudo, uma composição imunogénica pode incluir um adjuvante, que pode funcionar para melhorar as respostas imunitárias (humorais e/ou celulares) induzidas num

doente que recebe a composição. Os adjuvantes que podem ser utilizados com a invenção incluem:

- Uma composição contendo minerais, incluindo sais de cálcio e sais de alumínio (ou as suas misturas). Os sais de cálcio incluem fosfato de cálcio (*e. g.*, as partículas "CAP" divulgadas na ref. 71). Os sais de alumínio incluem hidróxidos, fosfatos, sulfatos, *etc.*, com os sais tomando qualquer forma adequada *(e. g.*, gel, cristalina, amorfa, *etc.)*. É preferida adsorção a estes sais. As composições contendo minerais podem também ser formuladas como uma partícula de sal metálico [72]. Podem ser utilizados os adjuvantes conhecidos como hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Estes nomes são convencionais mas são utilizados apenas para conveniência, como também não é uma descrição precisa do composto químico real que está presente (*e. g.*, ver capítulo 9 da referência 155). A invenção pode utilizar quaisquer dos adjuvantes "hidróxido" ou "fosfato" que estão em utilização geral como adjuvantes. Os adjuvantes conhecidos como "hidróxido de alumínio" são, tipicamente, sais de oxi-hidróxido de alumínio, que são, normalmente, pelo menos, parcialmente cristalinos. Os adjuvantes conhecidos como "fosfato de alumínio" são, tipicamente, hidroxifosfatos de alumínio, muitas vezes contendo também uma pequena quantidade de sulfato (*i. e.* sulfato de hidroxifosfato de alumínio). Estes podem ser obtidos por precipitação e as condições reaccionais e concentrações durante precipitação influenciam o grau de substituição de fosfato para hidroxilo no sal. A invenção pode utilizar uma mistura de um hidróxido de alumínio e de um fosfato de alumínio. Neste caso, pode existir mais fosfato de alumínio do que hidróxido *e. g.*, uma razão em

peso de, pelo menos, 2:1 *e. g.*, ≥5:1, ≥6:1, ≥7:1, ≥8:1, ≥9:1, *etc.* A concentração de Al^{+++} numa composição para administração a um doente é, de um modo preferido, menos de 10 mg/mL *e. g.*, ≤5 mg/mL, ≤4 mg/mL, ≤3 mg/mL, ≤2 mg/mL, ≤1 mg/mL, *etc.* Uma gama preferida está entre 0,3 e 1 mg/mL. É preferido um máximo de 0,85 mg/dose.

- Saponinas [capítulo 22 da ref. 155], que são um grupo heterólogo de glicósidos de esterol e glicósidos triterpenóides que são encontrados nas cascas, folhas, caules, raízes e até mesmo flores de uma vasta gama de espécies de plantas. A saponina da casca da árvore *Quillaia saponária* Molina tem sido vastamente estudada como adjuvantes. A saponina pode também ser comercialmente obtida de *Smilax ornata* (sarsaprilla), *Gypsophilla paniculata* (véu de noiva) e *Saponaria officianalis* (raiz de sabão). As formulações de adjuvante de saponina incluem formulações purificadas, tal como QS21, assim como formulações lipídicas, tal como ISCOM. QS21 é comercializada como Stimulon™. As composições de saponina têm sido purificadas utilizando HPLC e RP-HPLC. Têm sido identificadas fracções purificadas específicas utilizando estas técnicas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. De um modo preferido, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é divulgado na ref. 73. As formulações de saponina podem também compreender um esterol, tal como colesterol [74]. As combinações de saponinas e colesteróis podem ser utilizadas para formar partículas únicas designadas complexos imunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 da ref. 155]. Os ISCOM, tipicamente, também incluem um fosfolípido, tais como fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Pode ser utilizada qualquer saponina conhecida em ISCOM. De um modo preferido, o ISCOM inclui um

ou mais de QuilA, QHA & QHC. Os ISCOM são ainda descritos nas ref. 74-76. Opcionalmente, os ISCOM podem ser desprovidos de detergente adicional [77]. Uma revisão do desenvolvimento de saponina com base em adjuvantes pode ser encontrada nas ref. 78 & 79.

- Toxinas ADP-ribosilantes bacterianas *(e. g.,* a enterotoxina instável ao calor de *E. coli* "LT", toxina de cólera "CT" ou toxina de tosse convulsa "PT") e seus derivados destoxificados, tais como as toxinas mutantes conhecidas como LT-K63 e LT-R72 [80]. A utilização de toxinas ADP-ribosilantes destoxificadas como adjuvantes mucosais é descrita na ref. 81 e como adjuvantes parentéricos na ref. 82.
- Bioadesivos e mucoadesivos, tais como microesferas de ácido hialurónico esterificado [83] ou quitosano e seus derivados [84].
- Micropartículas (*i. e.* uma partícula de ~ 100 nm a ~ 150 µm de diâmetro, de um modo mais preferido, ~ 200 nm a ~ 30 µm de diâmetro, ou ~ 500 nm a ~ 10 µm de diâmetro) formadas a partir de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos *(e. g.,* um poli(ácido α-hidroxilo), um ácido poli-hidroxibutírico, um poli-ortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, *etc.*), com poli(lactido-co-glicólido) sendo preferido, opcionalmente tratado para possuir uma superfície negativamente carregada *(e. g.,* com SDS) ou uma superfície positivamente carregada *(e. g.,* com um detergente catiónico, tal como CTAB).
- Lipossomas (Capítulos 13 & 14 da ref. 155). Exemplos de formulações de lipossomas adequadas para utilização como adjuvantes são descritas nas ref. 85-87.

- Péptidos de muramilo, tais como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida ("DTP-DPP", ou "Theramide™), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").
- Um polímero de polioxidónio [88, 89] ou outro derivado de polietileno-piperazina N-oxidado.
- Um ligando CD1d, tais como uma α-glicosilceramida [90-97] (*e. g.*, α-galactosilceramida), α-glicosilceramidas contendo fitosfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101, 3'-O-sulfo-galactosilceramida, *etc.*
- Uma inulina gama [98] ou seu derivado, tal como algamulina.
- Uma emulsão óleo-em-água. São conhecidas várias dessas emulsões e estas, tipicamente, incluem, pelo menos, um óleo e, pelo menos, um tensioactivo, com o(s) óleo(s) e tensioactivo(s) sendo biodegradáveis (metabolizáveis) e biocompatíveis. As gotas de óleo na emulsão têm, de um modo geral, menos de 5 μm de diâmetro e podem ainda possuir um diâmetro sub-micron, com estas dimensões pequenas sendo conseguidas com um microfluidizador para proporcionar emulsões estáveis. As gotas com uma dimensão de menos de 220 nm são preferidas uma vez que estas podem ser submetidas a esterilização de filtro.
- Um oligonucleótido imunoestimulador, tal como um contendo um motivo CpG (uma sequência dinucleotídica contendo um resíduo de citosina não metilado ligado por uma ligação fosfato a um resíduo de guanosina) ou um motivo CpI (uma sequência dinucleotídica contendo citosina ligada a

inosina) ou um ARN de cadeia dupla ou um oligonucleótido contendo uma sequência palindrómica ou um oligonucleótido contendo uma sequência poli(dG). Os oligonucleótidos imunoestimuladores podem incluir análogos/modificações de nucleótidos, tais como modificações de fosforotioato e podem ser de cadeia dupla ou (excepto para ARN) de cadeia simples. As referências 99, 100 e 101 divulgam possíveis substituições análogas *e. g.*, substituição de guanosina com 2'-desoxi-7-deazaguanosina. O efeito adjuvante de oligonucleótidos CpG é ainda discutido nas ref. 102-107. Uma sequência CpG pode ser dirigida a TLR9, tal como o motivo GTCGTT ou TTCGTT [108]. A sequência CpG pode ser específica para induzir uma resposta imunitária Thl, tal como uma CpG-A ODN (oligodesoxinucleótido) ou pode ser mais específica para induzir uma resposta de célula B, tal como uma CpG-B ODN. As CpG-A e CpG-B ODN são discutidas nas ref. 109-111. De um modo preferido, o CpG é um CpG-A ODN. De um modo preferido, o oligonucleótido CpG é construído de modo que a extremidade 5' esteja acessível para reconhecimento de receptor. Opcionalmente, duas sequências de oligonucleótido CpG podem ser ligadas nas suas extremidades 3' para formar "imunómeros". Ver, por exemplo, referências 108 & 112-114. Um adjuvante CpG útil é CpG7909, também conhecido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Outro é CpG1826. Como alternativa, ou além disso, utilizando sequências CpG, podem ser utilizadas sequências TpG [115] e estes oligonucleótidos podem ser livres de motivos CpG não metilados. O oligonucleótido imunoestimulador pode ser rico em pirimidina. Por exemplo, pode compreender mais do que um nucleótido de timidina consecutivo (*e. g.*, TTTT, como divulgado na ref. 115), e/ou pode possuir uma composição de nucleótido com >25% de

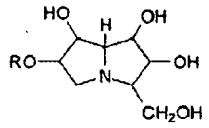
timidina (*e. g.*, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, *etc.*). Por exemplo, pode compreender mais do que um nucleótido de citosina consecutivo (*e. g.*,CCCC, como divulgado na ref. 115), e/ou pode possuir uma composição de nucleótido com >25% citosina (*e. g.*, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, *etc.*). Estes oligonucleótidos podem ser livres de motivos CpG não metilados. Os oligonucleótidos imunoestimuladores compreenderão, tipicamente, pelo menos, 20 nucleótidos. Estes podem compreender menos de 100 nucleótidos.

Um adjuvante particularmente útil baseado em torno de oligonucleótidos imunoestimuladores é conhecido como IC31™ [116]. Deste modo, um adjuvante utilizado com a invenção pode compreender uma mistura de (i) um oligonucleótido (*e. g.*, entre 15-40 nucleótidos) incluindo, pelo menos, um (e, de um modo preferido, múltiplos) motivos CpI e (ii) um polímero policatiónico, tal como um oligopéptido (*e. g.*, entre 5-20 aminoácidos) incluindo, pelo menos, uma (e, de um modo preferido, múltiplas) sequência(s) tripeptídica(s) Lys-Arg-Lys. O oligonucleótido pode ser um desoxinucleótido compreendendo sequência 26-mer 5'-$(IC)_{13}$-3'. O polímero policatiónico pode ser um péptido compreendendo aminoácido 11-mer Lys-Leu-Lys-Leu_5-Lys-Leu-Lys.

- Lípido A monofosforilado 3-O-desacilado ("3dMPL", também conhecido como "MPL™") [117-120]. Em condições aquosas, 3dMPL pode formar agregados micelares ou partículas com diferentes dimensões *e. g.*, com um diâmetro <150 nm ou >500 nm. Cada um ou ambos, destes, podem ser utilizados com a invenção e as melhores partículas podem ser seleccionadas por ensaios de rotina. São preferidas partículas mais pequenas (*e. g.*, pequenas o suficiente para obter uma

suspensão aquosa límpida de 3dMPL) para utilização de acordo com a invenção devido à sua actividade superior [121]. As partículas preferidas possuem um diâmetro médio de menos de 220 nm, de um modo mais preferido, menos de 200 nm ou menos de 150 nm ou menos de 120 nm e pode ainda possuir um diâmetro médio de menos de 100 nm. Na maioria dos casos, no entanto, diâmetro médio não será inferior a 50 nm.

- 5'-monofosfato de metilinosina ("MIMP") [122].
- Um composto de pirrolizidina poli-hidroxilada [123], tal como um possuindo fórmula:

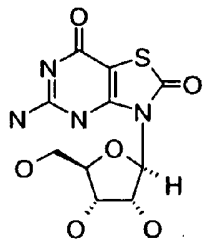


em que R é seleccionado do grupo compreendendo hidrogénio, grupos acilo, alquilo (*e. g.*, cicloalquilo), alcenilo, alcinilo e arilo, lineares ou ramificados, substituídos ou não substituídos, saturados ou insaturados ou um sal farmaceuticamente aceitável ou seu derivado. Exemplos incluem, mas não estão limitados a: casuarina, casuarina-6-α-D-glucopiranose, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-di*epi*-casuarina, *etc.*

- Um composto de imidazoquinolina, tal como Imiquimod ("R-837") [124, 125], Resiquimod ("R-848") [126] e os seus análogos; e seus sais (*e. g.*, os sais cloridrato). Os detalhes adicionais acerca de imidazoquinolinas imunoestimuladoras podem ser encontrados nas referências 127 a 131.
- Um composto de tiosemicarbazona, tal como os divulgados na referência 132. Os métodos de formulação, fabrico e

rastreamento para compostos activos são também descritos na referência 132. As tiosemicarbazonas são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas para a produção de citocinas, tal como TNF-α.

- Um composto de triptantrina, tal como os divulgados na referência 133. Os métodos de formulação, fabrico e rastreamento para compostos activos são também descritos na referência 133. As tiosemicarbazonas são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas para a produção de citocinas, tal como TNF-α.
- Um análogo nucleósido, tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



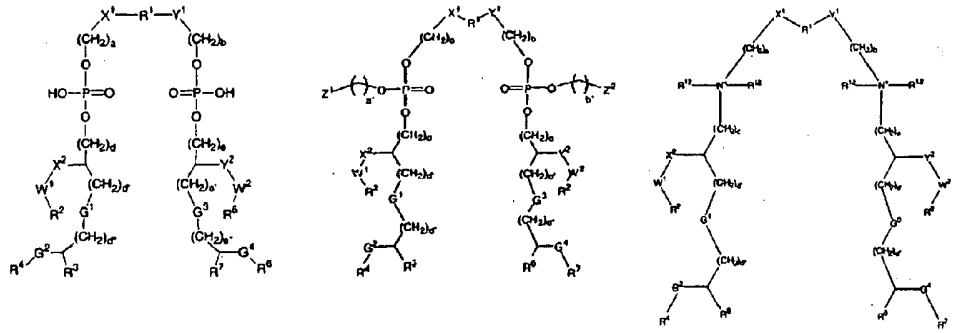
e seus profármacos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) os compostos divulgados nas referências 134 a 136 Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [137].

- Os compostos divulgados na referência 138, incluindo: compostos de Acilpiperazina, compostos de Indolediona, compostos de Tetra-hidra-isoquinolina (THIQ), compostos de Benzociclodiona, compostos de Aminoazavinilo, compostos de Aminobenzimidazole quinolinona (ABIQ) [139, 140], compostos de Hidraftalamida, compostos de Benzofenona, compostos de Isoxazole, compostos de Esterol, compostos de Quinazilinona, compostos de Pirrole [141], compostos de Antraquinona, compostos de Quinoxalina, compostos de

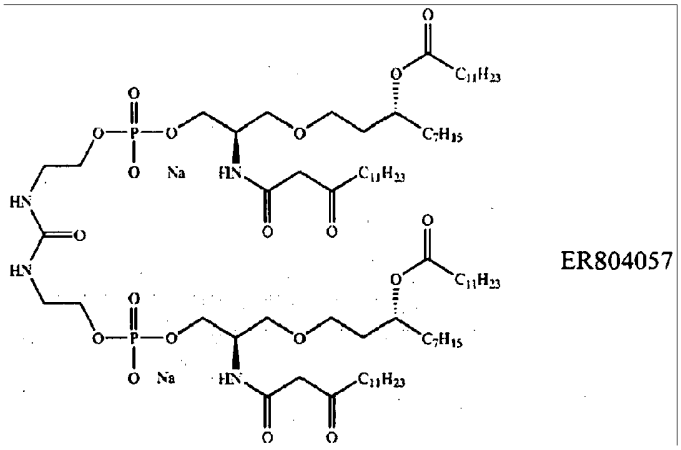
Triazina, compostos de Pirazalopirimidina e compostos de Benzazole [142].

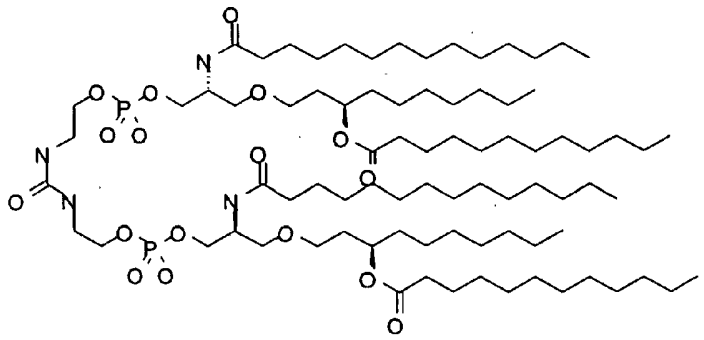
- Um derivado de fosfato de glucosaminida aminoalquilo, tal como RC-529 [143,144].
- Um fosfazeno, tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazeno] ("PCPP") como descrito, por exemplo, nas referências 145 e 146.
- Um composto de fórmula I, II ou III, ou um seu sal:

I II III



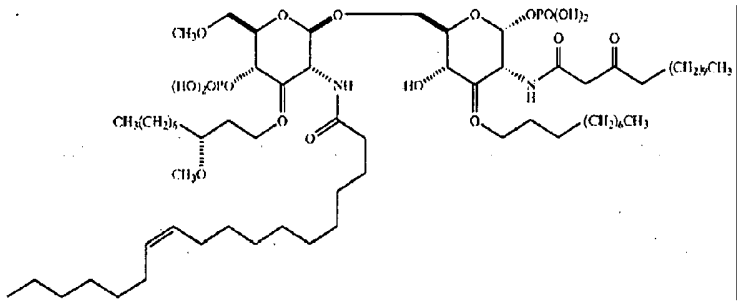
como definido na referência 147, tal como "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", ER 803022 ou "ER 804057" *e. g.:*





ER-803022:

- Derivados de lípido A de *Escherichia coli*, tal como OM-174 (descrito nas ref. 148 & 149).
- Compostos contendo lípidos ligados a um esqueleto acíclico contendo fosfato, tal como o antagonista de TLR4 E5564 [150, 151]:



Estes e outras substâncias activas adjuvantes são discutidos em maior detalhe nas referências 155 & 156.

Os antigénios e adjuvantes numa composição estarão, tipicamente, em mistura.

As composições podem incluir dois ou mais dos referidos adjuvantes. Por exemplo, estas podem incluir, de um modo vantajoso, uma emulsão óleo-em-água e 3dMPL, *etc.*

Os adjuvantes de emulsão óleo-em-água específicos úteis com a invenção incluem:

- Uma emulsão submicróne de esqualeno, Tween 80 e Span 85. A composição da emulsão, em volume, pode ser cerca de 5% de esqualeno, cerca de 0,5% de polissorbato 80 e cerca de 0,5% de Span 85. Em termos de peso, estas razões tornam-se 4,3% de esqualeno, 0,5% de polissorbato 80 e 0,48% de Span 85. Este adjuvante é conhecido como "MF59" [152-154], como descrito em maior detalhe no Capítulo 10 da ref. 155 e capítulo 12 da ref. 156. A emulsão MF59, de um modo vantajoso, inclui iões citrato *e. g.*, tampão de citrato de sódio 10 mM.
- Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol e Tween 80. A emulsão pode incluir soro fisiológico tamponado com fosfato. Pode também incluir Span 85 *(e. g.*, a 1%) e/ou lecitina. Estas emulsões podem possuir de 2 a 10% de esqualeno, de 2 a 10% de tocoferol e de 0,3 a 3% de Tween 80 e a razão em peso de esqualeno:tocoferol é, de um modo preferido, ≤1 uma vez que isto proporciona uma emulsão mais estável. O esqualeno e Tween 80 podem estar presentes em razão de volume de cerca de 5:2. Uma dessas emulsões pode ser feita dissolvendo Tween 80 em PBS para obter uma solução a 2%, depois, misturar 90 mL desta solução com uma mistura de (5 g de DL-α-tocoferol e 5 mL de esqualeno), depois, microfluidizar a mistura. A emulsão resultante pode possuir gotas de óleo submicróne *e. g.*, com um diâmetro médio entre 100 e 250 nm, de um modo preferido, cerca de 180 nm.
- Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol e um detergente Triton *(e. g.*, Triton X-100). A emulsão pode também incluir 3d-MPL (ver abaixo). A emulsão pode conter um tampão fosfato.
- Uma emulsão compreendendo um polissorbato *(e. g.*, polissorbato 80), um detergente Triton *(e. g.*,

Triton X-100) e um tocoferol (*e. g.*, um sucinato de α-tocoferol). A emulsão pode incluir estes três componentes a uma razão mássica de cerca de 75:11:10 (*e. g.*, polissorbato 80 750 µg/mL, Triton X-100 110 µg/mL e sucinato de α-tocoferol 100 µg/mL) e estas concentrações devem incluir qualquer contribuição destes componentes de antigénios. A emulsão pode também incluir esqualeno.

A emulsão pode também incluir um 3d-MPL (ver abaixo). A fase aquosa pode conter um tampão fosfato.

- Uma emulsão de esqualeno, polissorbato 80 e poloxâmero 401 ("Pluronic™ L121"). A emulsão pode ser formulada em soro fisiológico tamponado com fosfato, pH 7,4. Esta emulsão é um veículo de distribuição útil para dipéptidos de muramilo e tem sido utilizada com treonil-MDP no adjuvante "SAF-1" [157] (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de esqualeno, 2,5% de Pluronic L121 e 0,2% de polissorbato 80). Pode também ser utilizada sem o Thr-MDP, como no adjuvante "AF" [158] (5% de esqualeno, 1,25% de Pluronic L121 e 0,2% de polissorbato 80). É preferida microfluidização.
- Uma emulsão possuindo de 0,5-50% de um óleo, 0,1-10% de um fosfolípido e 0,05-5% de um tensioactivo não iónico. Como descrito na referência 159, componentes de fosfolípido preferidos são fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina e cardiolipina. As dimensões de gotas submicróne são vantajosas.
- Uma emulsão óleo-em-água submicróne de um óleo não metabolizável (tal como óleo mineral leve) e, pelo menos, um tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 ou Span 80). Podem ser incluídos aditivos, tais como QuilA saponina, colesterol, um conjugado saponina-lipofila (tal como GPI-0100, descrito na referência 160, produzido por adição

de amina alifática a desacilsaponina por meio do grupo carboxilo do ácido glucorónico), brometo de dimetiidioctadecilamónio e/ou N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.

- Uma emulsão em que uma saponina *(e. g.,* QuilA ou QS21) e um esterol *(e. g.,* a colesterol) são associados como micelas hélicas [161].

Tratamentos e utilizações médicas

A invenção também proporciona um conjugado Vi da invenção, para utilização em medicina *e. g.,* para utilização no aumento de uma resposta de anticorpo num mamífero.

A invenção também proporciona um método para o aumento de uma resposta imunitária num mamífero, compreendendo administrar um conjugado Vi ou composição farmacêutica da invenção ao mamífero.

A invenção também proporciona a utilização de um conjugado Vi da invenção no fabrico de um medicamento para a prevenção ou tratamento de febre tifóide num mamífero.

A resposta imunitária aumentou por estes métodos e as utilizações incluirão, de um modo geral, uma resposta de anticorpo, de um modo preferido, uma resposta de anticorpo protectora. Os métodos para avaliação de respostas de anticorpo após imunização de sacárido são bem conhecidas na técnica. A resposta de anticorpo é, de um modo preferido, uma resposta IgA ou IgG. A resposta imunitária pode ser profilática e/ou terapêutica. O mamífero é, de um modo preferido, um humano.

As composições da invenção serão, de um modo geral, administradas directamente a um doente. A distribuição directa pode ser conseguida por injecção parentérica (*e. g.*, subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente ou ao espaço intersticial de um tecido) ou por administração rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intradérmica, ocular, nasal, aural ou pulmonar. É preferida injecção ou administração intranasal.

A invenção pode ser utilizada para induzir imunidade sistémica e/ou de mucosa.

As vacinas preparadas de acordo com a invenção podem ser utilizadas para tratar crianças (incluindo bebés) e adultos. Deste modo, um indivíduo pode ter menos de 1 ano de idade, 1-5 anos de idade, 5-15 anos de idade, 15-55 anos de idade ou, pelo menos, 55 anos de idade. Os indivíduos preferidos para receber as vacinas são os jovens (*e. g.*, ≤5 anos de idade). As vacinas não são adequadas apenas para estes grupos, no entanto, e podem ser utilizadas, de um modo mais geral, numa população.

O tratamento pode ser por um esquema de dose única ou um esquema de dose múltipla. As doses múltiplas podem ser utilizadas num esquema de imunização primária e/ou num esquema de imunização mais reforçado. Num esquema de dose múltipla, as várias doses podem ser dadas pela mesma ou diferentes vias *e. g.*, uma primeira parentérica e reforço mucosal, uma primeira mucosal e reforço parentérico, *etc.* A administração de mais de uma dose (tipicamente duas doses) é particularmente útil em doentes imunologicamente simples. As doses múltiplas serão, tipicamente, administradas, pelo menos, 1 semana separadamente

(*e. g.*, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 6 semanas, cerca de 8 semanas, cerca de 10 semanas, cerca de 12 semanas, cerca de 16 semanas, *etc.)*. Um esquema exemplificativo proporciona uma primeira dose às 6 semanas de idade e uma segunda dose às 10 semanas de idade, para coincidir com imunizações de bebés existentes (co-administração com vacinas EPI). Este esquema primário pode ser seguido por uma dose mais reforçada após um primeiro aniversário da criança.

Os conjugados da invenção podem ser combinados com antigénios não Vi numa única composição para imunização simultânea contra múltiplos patogénios. Como uma alternativa para fazer uma vacina combinada, podem ser administrados conjugados aos doentes substancialmente ao mesmo tempo *(e. g.*, durante a mesma consulta ou visita médica a um profissional de saúde ou centro de vacinação) que outras vacinas. Os antigénios para utilização nestas vacinas de combinação ou para administração concomitante incluem, por exemplo, imunogénios de *Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus* e/ou *Pseudomonas aeuruginosa,* vírus da hepatite A, vírus da hepatite B, *Neisseria meningitidis* (tais como sacáridos ou sacáridos conjugados, para serogrupos A, C, W135 e/ou Y), *Streptococcus pneumoniae* (tais como sacáridos ou sacáridos conjugados), *etc.*

Numa forma de realização, uma composição pode compreender um conjugado Vi da invenção em combinação com um antigénio A de *Salmonella paratyphi*, tal como um antigénio H ou O *(e. g.*, um antigénio de sacárido O:2), para proporcionar uma vacina tifóide bivalente. Noutra forma de realização, uma composição pode compreender um conjugado Vi da invenção em combinação com um antigénio de *Salmonella typhimurium*, tal como um antigénio H ou

O (*e. g.*, um sacárido O:9). Noutra forma de realização, uma composição pode compreender um conjugado Vi da invenção em combinação com um antigénio de *Salmonella enteritidis*, tal como um antigénio H ou O (*e. g.*, um sacárido O:4,5).

Definições

O termo "compreendendo" abrange "incluindo" assim como "consistindo" *e. g.*, uma composição "compreendendo" X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir algo adicional *e. g.*, X + Y.

O termo "substancialmente" não exclui "completamente" *e. g.*, uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Quando necessário, o termo "substancialmente" pode ser omitido da definição da invenção.

A expressão "cerca de" em relação a um valor numérico x é opcional e significa, por exemplo, *x* ± 10%.

Quando são utilizados materiais animais (e particularmente bovino) no cultivo de células, estes devem ser obtidos de fontes que são livres de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE) e, em particular, livres de encefalopatia espongiforme bovina (BSE). De um modo geral, é preferido cultivar células na ausência total de materiais derivados de animais.

Quando um composto é administrado ao corpo como parte de uma composição, então, esse composto pode, em alternativa, ser substituído por um profármaco adequado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 representa a fórmula estrutural de *S.typhi* Vi (ácido α1,4-*N*-acetilgalactosaminourónico).

A Figura 2 mostra um esquema reaccional para a preparação de proteínas derivatizadas.

A Figura 3 mostra uma análise SEC de CRM_{197} e CRM_{197} derivatizado com ADH.

A Figura 4 mostra uma análise SEC de toxóide de tétano derivatizado com ADH.

A Figura 5 mostra padrões SDS page, da esquerda para a direita, de TT, TT_{ADH}, CRM e CRM_{ADH}.

A Figura 6 mostra um esquema reaccional para a preparação de um conjugado Vi-proteína.

A Figura 7 e a Figura 8 mostram perfis de filtração em gel de Vi e toxóide de tétano em Sephacryl S-1000.

A Figura 9 mostra um perfil de filtração em gel de "agrupamento 1" e a Figura 10 mostra um perfil de "agrupamento 2".

A Figura 11 mostra uma análise SEC de Vi-TT_{ADH}.

A Figura 12 mostra um perfil SDS-PAGE (gel 3-8%) de misturas reaccionais de Vi-CRM_{ADH} após diálise. A linha 2 é CRM_{ADH} (5 µg), as Linhas 3-5 são 10 µL das misturas reaccionais após diálise dos Lotes 04-06, respectivamente.

A Figura 13 mostra a purificação do Lote 06 em Sephacryl S-1000.

A Figura 14 mostra um perfil SDS-PAGE (gel 3-8%) de: "2" - 3 µg de CRM_{ADH}, "3" - 10 µL de mistura reaccional e fracções 1-11 e 12-22 da purificação do Lote 06.

As Figuras 15 a 17 mostram análises SEC comparando agrupamentos 1 obtidos dos Lotes 04-06, agrupamentos 2 obtidos dos Lotes 04-06 e agrupamentos 1 e 2 obtidos do Lote 06.

A Figura 18 mostra os valores de anticorpo anti-Vi médios. As Figuras 18A e 18B mostram dados de diferentes lotes de conjugados, mas os grupos de controlo são iguais em cada. Da esquerda para a direita, os grupos em 18A e 18B são: PBS; Vi; Vi+CRM197; Vi+TT; Vi-CRM197; Vi-TT; Vi-CRM197 com alúmen; Vi-TT com alúmen; e Vi-CRM197 com CFA+IFA.

MODOS PARA REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Purificação de Vi

O sobrenadante de uma amostra de 5 L de C. *freundii WR7001* em mod-LB foi concentrado (20 vezes) a 250 mL com uma membrana 100K. A amostra foi diafiltrada contra NaCl 1 M (2,5 L) e depois com água (1,5 L), novamente com uma membrana 100K e o

permeato descartado. Utilizou-se um filtro de 0,22 µm para remover a turbidez. Subsequentemente, adicionou-se CTAB a 0,9% para formar um precipitado Vi-CTAB. Este foi centrifugado a 18000 g durante 15 minutos e o sobrenadante descartado.

O precipitado foi suspenso em etanol (96%, 110 mL) e misturado, de um dia para o outro, à TA, antes de centrifugação subsequente a 18000 g, durante 50 minutos, após a qual o precipitado resultante foi descartado. Adicionou-se NaCl 0,1 M ao sobrenadante para formar um gel que foi centrifugado a 18000 g durante 10 minutos. O precipitado foi recolhido e lavado com etanol, depois solubilizado em NaCl aquoso (1 M, 50 mL) e filtrado. O retentado foi colocado em etanol a 80% e centrifugado a 18000 g, durante 10 minutos. O precipitado foi novamente lavado com etanol. Uma parte do precipitado permaneceu em suspensão (Lote A). As duas partes foram recolhidas separadamente como Lote A (97 mg) e Lote B (170 mg).

Num processo modificado, o sobrenadante foi concentrado a 8,0-10,0 g/L com uma membrana 100K. Uma amostra foi diafiltrada contra NaCl 1 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,0 2M pH 7,3 (2,5 L) e depois com água (2,5 L), novamente com uma membrana 100K e o permeato foi descartado. Subsequentemente, adicionou-se CTAB a 2,0% para formar um precipitado Vi-CTAB. O precipitado foi centrifugado a 18000 g, durante 15 minutos, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi depois lavado com água, centrifugado e re-suspenso em etanol (85%) e misturado até completamente solubilizado. A solução foi passada através de SP10 e filtros de carvão. O filtrado foi precipitado com NaCl 0,2 M e centrifugado a 18000 g, durante 5 minutos. O precipitado foi re-suspenso em NaCl 1,0 M para obter uma concentração de 3-5 mg/mL. Esta solução foi diafiltrada contra água e com filtro de 0,22 µM.

O processo de purificação possui um bom rendimento e proporciona sacárido com boa pureza (menos de 0,5% de proteína, menos de 0,01% de ácido nucleico) e é suave o suficiente para conservar elevados níveis de O-acetilação.

Derivatização de toxoide de tétano

Adicionaram-se ADH (3,25 por mg de proteína) e cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) (EDAC/proteína = 0,152 p/p) a toxóide de tétano (em tampão de ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico (MES) 50-100 mM, pH 6,18 a 6,20). A reacção foi realizada durante 1 hora à temperatura ambiente.

A mistura reaccional foi dializada contra NaCl 0,2 M, tampão MES 5 mM, pH 7,05, 2-8 ºC e tampão MES 5 mM, pH 7,00, 2-8 ºC. Obteve-se toxóide de tétano derivatizado (rendimento de 86%).

Derivatização de CRM_{197}

Adicionaram-se ADH (3,5 mg por mg de proteína) e EDAC (EDAC/proteína = 0,15 p/p) a CRM_{197} (11,5 mg/mL em tampão MES 50-100 mM, pH 6,0). A reacção foi realizada durante 1 hora à temperatura ambiente, pH 6,0-6,2. A manutenção do pH nesta gama impediu a precipitação de proteína.

A mistura reaccional foi dializada, de um dia para o outro, contra tampão MES 5 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,0 e depois contra

tampão MES 5 mM, pH 7,0 a 4 ºC. A proteína foi medida por análise microBCA (rendimento de 75-85%). Adicionou-se sacarose a 10% p/v ao produto e armazenou-se a -20 ºC. Em vez de armazenar com sacarose, contudo, pode ser armazenada em MES 5 mM, pH 7,0.

Caracterização da proteína derivatizada

A derivatização das proteínas com ADH foi verificada por um método colorimétrico (método TNBS).

A razão molar de ADH para TT foi medida por MS Maldi-Tof como cerca de 11.

A razão molar de ADH para CRM_{197} foi medida por MS Q-Tof. Isto mostrou a formação de vários produtos caracterizados pela presença de um número diferente de ligantes ligados à proteína (de 3 a 10, contendo o produto principal 6 ligantes ligados).

As proteínas derivatizadas (e, subsequentemente, os conjugados) foram examinadas por electroforese de gel em dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando 3-8% de géis tris-acetato (NuPAGE). Adicionaram-se amostras (5-20 µL para ter um teor de proteína de 5 µg) de DTT 0,5 M (1/5 v/v) e de Tampão Amostra NuPAGE LDS (1/5 v/v). As misturas foram aquecidas a 100 ºC, durante 1 minuto, e as amostras aplicadas aos poços. O gel foi submetido a electroforese a 30 mA em Tampão de Corrida Tris-Acetato SDS (Invitrogen). No final, foi colorido com Coloração Simply Blue Safe (Invitrogen).

Os padrões SDS-PAGE e perfis SEC (214 nm, gel TSK 4000; tampão fosfato 100 mM + NaCl 100 mM + CH_3CN a 5%, pH 7,0) das

proteínas derivatizadas verificaram-se ser semelhantes aos das proteínas nativas (ver Figura 3 a Figura 5).

Conjugação de Vi a toxóide de tétano derivatizado

Adicionou-se EDAC (4,4 mg) a Vi (4,6 mg) numa solução tamponada a pH 6,08 (1,5 mL de tampão MES 200 mM) e deixou-se reagir durante 2 minutos à temperatura ambiente.

Deixou-se reagir toxóide de tétano derivatizado (9,2 mg) numa solução tamponada a pH 7,0 (1,5 mL de tampão MES 5 mM) com o Vi activado durante 3 horas à temperatura ambiente ($[TT_{ADH}]$ = 3,15 mg mL^{-1}, [Vi] = 1,53 mg mL^{-1}, Razão TT_{ADH}/Vi (p) = 2, [EDAC] = 1,5 mg mL^{-1}).

A mistura reaccional foi dializada contra NaCl 0,2 M, tampão fosfato 10 mM, pH 7,07, 4 ºC e purificada por Sephacryl S-1000 (1,5 x 90 cm) em tampão fosfato 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7,00. Durante a purificação de conjugado, recolheram-se dois agrupamentos diferentes (ver Figura 7), que foram caracterizados por um PM diferente. Os perfis de filtração de gel de Vi e de TT em Sephacryl S-1000 mostram (ver Figura 7 e Figura 8):

- purificação de conjugado a partir da proteína livre é fazível (agrupamento 1).
- purificação de conjugado a partir de sacárido livre não é fazível (agrupamento 2 - Vi livre co-elui com o conjugado).

O Agrupamento 1 deve, portanto, conter menos Vi livre do que o agrupamento 2.

A Figura 9 mostra o perfil em Sephacryl S1000 (1,6 x 90 cm) da proteína não conjugada com fosfato 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7 a um caudal de 0,2 mL/min. A Figura 10 mostra o perfil em Sephacryl S1000 (nas mesmas condições) de Vi livre.

Os agrupamentos 1 e 2 foram dializados contra tampão fosfato 2 mM pH 7,0 e os seus teores foram os seguintes:

Conjugado Vi-TT_{ADH}	Teor de proteína (micro BCA)	Teor de sacárido (laranja de acridina)	Razão (p/p) sacárido/proteína
Agrupamento 1	2,46 mg	1,02 mg	0,41
Agrupamento 2	5,56 mg	3.73 mg	0,67

O conjugado foi caracterizado por análise SEC (ver Figura 11, 214 nm, gel TSK 6000; tampão fosfato 100 mM + NaCl 100 mM + CH_3CN a 5%, pH 7,0):

- agrupamento 1 de PSVi-TT_{ADH}: polissacárido 26,8 µg/mL; proteína 64,64 µg/mL
- agrupamento 2 de PSVi-TT_{ADH}: polissacárido 82,8 µg/mL; proteína 123,68 µg/mL
- PSVi: 1,4 mg/mL
- TT_{ADH}: 0,1 mg/mL

Conjugação de Vi a CRM_{197} derivatizado

Prepararam-se três lotes (“04”, “05’ e “06”) diferentes de Vi-CRM_{ADH} como se segue:

Adicionou-se EDAC (4,4 mg) a Vi (4,6 mg, obtendo uma razão molar EDAC:Vi de cerca de 1,43:1) numa solução tamponada a pH 6,0 (1,65 mL de tampão MES 20 mM) e misturou-se durante 2 minutos à temperatura ambiente. (Em experiências posteriores, por comparação, reduziu-se a quantidade de EDAC, utilizando razões molares de 5:1 e 9:1. Os conjugados CRM197 obtidos com estes sacáridos derivatizados foram melhor caracterizáveis e reproduzíveis com <5% de CRM-ADH não conjugado. A razão 5:1 foi melhor do que a 1,4:1, e a razão 9:1 foi melhor do que a 5:1).

O CRM_{197} derivatizado (9,2 mg) numa solução tamponada a pH 7,0 (1,085 mL de tampão MES 5 mM) foi deixado reagir com o Vi activado durante 3 horas à temperatura ambiente ($[CRM_{ADH}]$ = 3,07 mg mL^{-1}, [Vi] = 1,53 mg mL^{-1}, Razão CRM_{ADH}/Vi (p) = 2, [EDAC] = 1,47 mg mL^{-1}), durante a qual o pH foi mantido a 6,0-6,20 utilizando tampão MES de modo a evitar precipitação.

Como indicado acima, adiciona-se CRM_{ADH} em tampão MES 5 mM, pH 7. É necessário que a mistura final esteja em tampão MES não inferior a 50-60 mM a pH 6 para manter o pH constante durante a própria reacção.

A mistura reaccional foi purificada por coluna de Sephacryl S1000 (1,5 x 90 cm) em tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7 a 4 ºC.

Como meio alternativo de purificação, o CRM_{ADH} pode ser removido do conjugado por ultrafiltração tangencial (membrana 100K ou 300K) como se segue: mistura reaccional diluída de 15 a 50 mL com tampão fosfato 10 mM pH 7,2; membrana: Vivaflow 200 cm^2 100K (celulose regenerada); P_{in}: 1,2-1,3 bar; P_{out}: 0,4 bar; caudal: 22,4 mL/min; volume de permeato: 1,4 L; (28 ciclos com

tampão fosfato 10 mM pH 7,2); volume de retentato final de 152 mL.

O conjugado foi caracterizado por microBCA (teor de proteína), titulação com laranja de acridina e RMN/HPAEC-PAD (teor de sacárido),RMN de ^{1}H (quantificação de nível de O-acetilo e derivado EDAC), HPLC e SDS-PAGE.

A Figura 13 mostra a purificação de Lote 06 em Sephacryl S-1000 (Sephacryl S1000 1,6 cm x 90 cm; Caudal: 0,2 mL/min, Eluente: NaCl 200 mM, NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,0). Recolheram-se fracções (1-11 e 12-22 para Lote 06) para cada Lote em dois agrupamentos diferentes, distinguidos por PM. O primeiro agrupamento (fracções anteriores) foi purificado de sacárido livre, enquanto o segundo continha uma quantidade indeterminada de sacárido livre.

Os agrupamentos foram dializados contra NaH_2PO_4 2 mM, pH 7,5, a 4 ºC, de um dia para o outro e os teores foram:

Conjugado	conc. de sacárido (µg/mL) HPAEC-PAD	conc. de sacárido (µg/mL) laranja de acridina	conc. de proteína (µg/mL)	Razão PS/proteína (p/p) HPAEC-PAD ou laranja de acridina		% de rendimento em proteína	% de rendimento em sacárido (HPAEC-PAD)
$Vi-CRM_{ADH}$ Lote 04 Agrupamento 1	24,37	32,75	52,06	0,47	0,63	64,90	84,31

(continuação)

Conjugado	conc. de sacárido (µg/mL) HPAEC-PAD	conc. de sacárido (µg/mL) laranja de acridina	conc. de proteína (µg/mL)	Razão PS/proteína (p/p) HPAEC-PAD ou laranja de acridina		% de rendimento em proteína	% de rendimento em sacárido (HPAEC-PAD)
Vi-CRM_{ADH} Lote 04 Agrupamento 2	78,36	59,15	106,1	0,74	0,56		
Vi-CRM_{ADH} Lote 05 Agrupamento 1	34,51	35,95	63,17	0,55	0,57	63,94	86,82
Vi-CRM_{ADH} Lote05 Agrupamento 2	71,39	64,6	93,42	0,76	0,69		
Vi-CRM_{ADH} Lote06 Agrupamento 1	39,12	29,55	59,1	0,66	0,5	56,89	86,23
Vi-CRM_{ADH} Lote 06 Agrupamento 2	67,73	50	82,41	0,82	0,61		

As figuras 15 a 17 mostram análises SEC comparativas destes agrupamentos (gel TSK 6000PW (TosoHaas) coluna analítica (7,5 mm x 30,0 cm), eluente: NaCl 100 mM, NaH_2PO_4 100 mM, CH_3CN a 5%, pH 7,2; Caudal: 0,5 mL/min; V_0: ~ 13,5 min - V_t: ~ 27,8 min).

O conjugado foi filtrado estéril (0,22 µm), aliquotado e armazenado a -80 ºC (4 ºC).

***Determinação de actividade* in vivo**

Antigénios utilizados

Foram utilizados conjugados Vi-TT preparados no exemplo anterior. O Lote 03 de Vi-CRM_{ADH} foi preparado utilizando substancialmente as mesmas condições que os Lotes 04 a 06 de Vi-CRM_{ADH}. O Lote 01 de Vi-CRM_{ADH} foi também preparado utilizando substancialmente as mesmas condições que os Lotes 04 a 06 de Vi-CRM_{ADH}, mas com a diferença de que a razão CRM_{ADH}/Vi (p) era igual a 1. O soro de ratinho hiperimune imunizado com Vi-rEPA foi obtido do NIH.

Características do conjugado

Conjugado	**Teor de proteína (micro BCA)**	**Teor de sacárido (laranja de acridina)**	**Razão (p/p) sacárido/ proteína**
a) Vi-CRM_{ADH} Lote 01	3,18 mg	3,65 mg	1,15
b) Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2	4,13 mg	2,93 mg	0,71
c) Vi-TT_{ADH} Agrupamento 1	2,46 mg	1,02 mg	0,41
d) Vi-TT_{ADH} Agrupamento 2	5,56 mg	3,73 mg	0,67

Concepção de estudo

Grupo	Imunização	Dose (µg)	Nº de injecções	Dias de sangue	Via
1	PBS	-	3	0, 14, 28, 42	SC
2	Vi	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
3	Vi + CRM_{ADH}	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
4	Vi + TT_{ADH}	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
5	Vi-CRM_{ADH} Lote 01	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
6	Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
7	Vi-TT_{ADH} Agrupamento 1	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
8	Vi-TT_{ADH} Agrupamento 2	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
9[a]	Vi-CRM_{ADH} Lote 01	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
10[a]	Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
11[a]	Vi-TT_{ADH} Agrupamento 1	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
12[a]	Vi-TT_{ADH} Agrupamento 2	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
13[b]	Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2	10	1-2-3	0, 14, 28, 42	SC
14[b]	Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2	10	1-2-3	0, 14, 28, 42	SC

a: conjugados foram adjuvados com alúmen

b: 1ª imunização foi adjuvada com CFA, 2ª e 3 ª imunizações com IFA

Imunizações

Ratinhos fêmea Balb/c foram divididos em catorze grupos de oito ratinhos em cada e foram, subcutaneamente, imunizados com 2,5 µg de Vi, conjugado Vi ou uma mistura física de Vi e proteína transportadora derivatizada ADH. Apenas os grupos 13 e 14 receberam 10 µg de dose de imunização.

Foram dadas três injecções de 200 µL cada, a cada duas semanas, com sangramentos duas semanas após cada imunização.

Os grupos 9 a 12 receberam alúmen como adjuvante, enquanto o adjuvante para os grupos 13 & 14 foi adjuvante de Freund completo (CFA, 1ª injecção) e adjuvante de Freund incompleto (IFA, 2ª & 3ª injecção).

Método ELISA

Os poços de placas ELISA de 96 poços (Maxisorp, Nunc) foram revestidos com 100 µL de Vi 1 µg/mL em tampão carbonato (0,05 M, pH: 9,6) e deixados, de um dia para o outro, a 4 ºC. O Vi utilizado para revestimento foi purificado a partir de *Citrobacter freundii* WR7011. Na manhã seguinte, as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de leite desnatado a 5% em PBS-Tween 20 (PBST, 0,05%) durante 1 hora à temperatura ambiente (TA). Após lavagem com PBST, 100 µL/poço de soros de ratinhos (1:200 diluídos em PBST com BSA a 0,1%) foram incubados durante 2 horas à TA. Após mais três lavagens, anticorpo secundário IgG anti-ratinho de cabra conjugado a fosfatase alcalina (Sigma A3438, 1:10000 diluído em PBST, BSA a 0,1%) foi incubado a 100 µL/poço durante 1 hora à TA. O substrato de fosfatase alcalina (p-NPP,

Sigma N2765) foi dissolvido em tampão dietanolamina (1 M, pH: 9,8) e incubado após outra lavagem durante 1 hora à TA. As placas foram lidas a 405 e 490 nm utilizando um leitor ELISA. Os valores de absorvância utilizados para determinação de unidades de anticorpos foram obtidos subtraindo valores de 490 nm a 405 nm. As unidades de anticorpos são expressas em relação a soro padrão anti-Vi de ratinho hiperimune, após análise Gráfico de Hill.

Um soro de ratinho hiperimune imunizado com Vi-rEPA foi utilizado como controlo positivo interno.

Cada soro de ratinho foi corrido em triplicado em três placas ELISA diferentes e os dados foram apresentados como média aritmética e erros padrão. Uma unidade de anticorpo é definida como o recíproco da diluição dos soros padrão que produz uma densidade óptica igual a 1 num padrão ELISA.

Valores de anticorpo Anti-CRM em grupos 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14

		Média			Erro Padrão		
Grupo	Imunização	T14	T28	T42	T14	T28	T42
1	PBS	-0,41	-0,64	-0,77	0,12	0,14	0,09
2	Vi	-0,89	-0,58	-0,65	0,14	0,17	0,07
3	Vi + CRM	0,09	34,88	256,81	0,25	16,11	42,99
5	Vi-CRM_{ADH} Lote 01	3,80	149,80	311,68	1,19	47,20	49,33
6	Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2	7,30	163,06	550,38	2,64	50,91	44,70

(continuação)

		Média			Erro Padrão		
Grupo	Imunização	T14	T28	T42	T14	T28	T42
9	Vi-CRM_{ADH} Lote 01/alúmen	14,86	379,57	721,00	5,98	49,88	34,96
10	Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2/ alúmen	44,73	263,46	452,91	7,27	16,74	29,09
13	Vi-CRM_{ADH} Lote 01	50,91	586,61	762,92	15,29	41,35	65,50
14	Vi-CRM_{ADH} Lote 01	69,18	672,56	841,66	22,68	53,35	43,42

Valores de anticorpo Anti-Vi em todos os grupos

		Média			Erro Padrão		
Grupo Nº	Imunização	T14	T28	T42	T14	T28	T42
1	PBS	3,3	-1,03	-1,54	0,5	0,81	0,52
2	Vi	-3,4	-1,94	-0,04	0,4	0,52	0,52
3	Vi + CRM	5,0	-0,14	0,03	0,8	1,04	0,65
4	Vi + TT	1,1	2,51	1,31	1,3	1,23	0,39
5	Vi-CRM_{ADH} Lote 01	53,7	242,20	191,53	8,4	31,40	40,50
6	Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2	95,4	245,39	225,66	40,9	45,33	38,00
7	Vi-TT_{ADH} Agrupamento 1	75,5	170,20	160,49	18,0	27,17	34,25

		Média			Erro Padrão		
8	Vi-TT_{ADH} Agrupamento 2	58,2	126,23	126,20	13,1	18,50	17,74
9	Vi-CRM_{ADH} Lote 01/alúmen	56,4	162,52	98,58	13,4	24,15	22,59
10	Vi-CRM_{ADH} Lote 03 Agrupamento 2/ alúmen	58,7	98,92	93,22	18,8	24,87	30,55
11	Vi-TT_{ADH} Agrupamento 1/ alúmen	44,6	191,81	151,56	18,3	36,76	38,83
12	Vi-TT_{ADH} Agrupamento 2/ alúmen	68,1	202,99	180,09	18,0	24,89	21,73
13	Vi-CRM_{ADH} Lote 01	65,3	271,48	264,39	16,3	33,38	63,96
14	Vi-CRM_{ADH} Lote 01	134,5	202,51	234,78	32,2	86,61	64,27
	NIH			149,02			24,56

Os resultados são representados graficamente na Figura 18.

REFERÊNCIAS

[1] Guzman *et al.* (2006) *Vaccine* 24(18):3804-11.

[2] Canh *et al.* (2004) *Infect Immun.* 72(11):6586-8.

[3] Kossaczka *et al.* (1997) *Infect Immun* 65(6):2088-93.

[4] Clark *et al.* (1958) *J Biol Chem* 230:81-89.

[5] Heyns *et al.* (1967) *Carbohydr Res* 3:340-353.

[6] Heyns *et al.* (1959) *Chem Ber* 92:2435-2438.

[7] Webster *et al.* (1954) *Arch Biochem Biophys* 50:223-224.

[8] Webster *et al.* (1954) *J Immunol* 73:16-22.

[9] Whiteside *et al.* (1961) *J Immunol* 86:538-542.

[10] Kao *et al.* (2004) *Vaccine* 22:335-344.

[11] Szu *et al.* (1991) *Infect Immun* 59(12):4555-61.

[12] Ravenscroft *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.

[13] Szu *et al.* (1994) *Infect Immun* 62(12):5545-9.

[14] Documento WO 96/011709.

[15] Documento US-A-2005/0106181.

[16] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.

[17] Documento WO 98/32873.

[18] Patente Europeia 0072513.

[19] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36

[20] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-8

[21] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii

[22] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567

[23] Documento EP-B-0 477 508

[24] Patente US 5306492

[25] Documento WO 98/42721

[26] Dick *et al.* in *Conjugates Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, 48-114

[27] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego CA (1996)

[28] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-6.

[29] Documento WO 99/42130

[30] Documento WO 98/42721

[31] Patente US 4882317

[32] Patente US 4695624

[33] *Mol. Immunol.*, 1985, 22, 907-919

[34] Documento EP-A-0208375

[35] Bethell G.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 2572-4

[36] Hearn M.T.W., *J. Chromatogr.*, 1981, 218, 509-18

[37] Patente US 4965338

[38] Documento WO 00/10599.

[39] Gever *et al.*, Med. Microbiol. Immunol, 165: 171-288 (1979).

[40] Patente US 4057685.

[41] Patentes US 4673574; 4761283; 4808700,

[42] Patente US 4459286.

[43] Patente US 5204098

[44] Patente US 4663160,

[45] Documento WO 2007/000343.

[46] Szu *et al.* (1987) *J Exp Med* 1166(5):1510-24.

[47] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)

[48] Documento EP-A-0372501.

[49] Documento EP-A-0378881.

[50] Documento EP-A-0427347.

[51] Documento WO 93/17712

[52] Documento WO 94/03208.

[53] Documento WO 98/58668.

[54] Documento EP-A-0471177.

[55] Documento WO 91/01146

[56] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.

[57] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.

[58] Documento EP-A-0594610.

[59] Ruan *et al.* (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.

[60] Documento WO 00/56360,

[61] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.

[62] Michon *et al.* (1998) *Vaccine*. 16:1732-41.

[63] Documento WO 02/091998.

[64] Documento WO 01/72337

[65] Documento WO 00/61761.

[66] Documento WO 00/33882
[67] Documento WO 99/42130
[68] Documento WO 96/40242
[69] Gennaro (2000) Re*mington: The Science e Practice of Pharmacy*. 20ª edição, ISBN: 0683306472.
[70] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
[71] Patente US 6355271.
[72] Documento WO 00/23105.
[73] Documento US 5057540,
[74] Documento WO 96/33739.
[75] Documento EP-A-0109942.
[76] Documento WO 96/1171.
[77] Documento WO 00/07621.
[78] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
[79] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
[80] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
[81] Documento WO 95/17211.
[82] Documento WO 98/42375.
[83] Singh *et al.*] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
[84] WO 99/27960,
[85] Documento US 6090406
[86] Documento US 5916588
[87] Documento EP-A-0626169.
[88] Dyakonova *et al.* (2004) Int Immunopharmacol 4(13):1615-23.
[89] Documento FR-2859633.
[90] De Libero *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496
[91] Patente US 5936076.
[92] Oki *et al.*, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640

[93] Documento US2005/0192248

[94] Yang *et al.*, *Angew. Chem. Int.* Ed., 2004, 43: 3818-3822

[95] Documento WO2005/102049

[96] Goff *et al.*, *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603

[97] Documento WO 03/105769

[98] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80,

[99] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400,

[100] Documento WO 02/26757.

[101] Documento WO 99/62923.

[102] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.

[103] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.

[104] Documento WO 98/40100,

[105] Patente US 6207646.

[106] Patente US 6239116.

[107] Patente US 6429199.

[108] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions 31* (parte 3):654-658.

[109] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.

[110] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.

[111] Documento WO 01/95935.

[112] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.

[113] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.

[114] Documento WO 03/035836.

[115] Documento WO 01/22972.

[116] Schellack *et al.* (2006) *Vaccine* 24:5461-72.

[117] Myers *et al.* (1990) páginas 145-156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.*

[118] Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) da referência 156.
[119] Johnson *et al.* (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
[120] Baldrick *et al.* (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
[121] Documento WO 94/21292.
[122] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
[123] Documento WO 2004/064715.
[124] Documento US 4680338.
[125] Documento US 4988815.
[126] Documento WO 92/15582.
[127] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
[128] Wu *et al.* (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
[129] Vasilakos *et al.* (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
[130] Patentes US 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 e 6924293.
[131] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
[132] Documento WO 2004/060308.
[133] Documento WO 2004/064759.
[134] Documento US 6924271.
[135] Documento US 2005/0070556.
[136] Documento US 5658731.
[137] Patente US 5011828.
[138] Documento WO2004/87153.
[139] Documento US 6605617.
[140] Documento WO 02/18383.
[141] Documento WO 2004/018455.

[142] Documento WO 03/082272.
[143] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
[144] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
[145] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
[146] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
[147] Documento WO 03/011223.
[148] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
[149] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
[150] Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
[151] Documento US 2005/0215517.
[152] Documento WO 90/14837.
[153] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
[154] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680,
[155] *Vaccine Design: The Subunit e Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
[156] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods e Research Protocols* (Volume 42 de *Methods in Molecular Medicine series*). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
[157] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
[158] Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
[159] Documento WO 95/11700,
[160] Patente US 6080725.
[161] Documento WO 2005/097181.

Lisboa, 13 de Maio de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um conjugado de Vi compreendendo os passos de:

   a) simultaneamente, combinar um ligante di-hidrazida do ácido adípico, 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) e uma proteína transportadora;
   b) remover qualquer ligante em excesso do produto do passo a);
   c) fazer reagir Vi com EDAC a uma razão molar Vi:EDAC de ≥5:1; e
   d) fazer reagir o produto do passo b) com o produto do passo c).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a razão molar Vi:EDAC é ≥9:1.

3. Método de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o ligante em excesso é removido por diálise.

4. Método de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que a proteína transportadora é CRM197 ou toxóide de tétano.

5. Conjugado passível de obter por um método de acordo com qualquer reivindicação anterior.

6. Conjugado compreendendo Vi ligado a CRM197.

7. Conjugado de acordo com a reivindicação 6, em que o Vi está ligado ao CRM197 por um ligante di-hidrazida do ácido adípico (ADH).

8. Composição farmacêutica compreendendo o conjugado de qualquer das reivindicações 5 a 7 em combinação com um transportador farmaceuticamente aceitável.

9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, em que a composição é não ajduvada ou em que a composição compreende ainda um adjuvante.

10. Composição farmacêutica de reivindicação 8 ou reivindicação 9, compreendendo soro fisiológico.

11. Composição farmacêutica de qualquer das reivindicações 8 a 10, em que a dose unitária da composição inclui 5 µg de sacárido Vi.

12. Conjugado de qualquer das reivindicações 5 a 7 para utilização num método para o aumento de uma resposta imunitária num mamífero, o método compreendendo administrar o conjugado ao mamífero.

13. Composição farmacêutica de qualquer das reivindicações 8 a 11 para utilização num método para o aumento de uma resposta imunitária num mamífero, o método compreendendo administrar a composição farmacêutica ao mamífero.

Lisboa, 13 de Maio de 2015

FIGURA 1

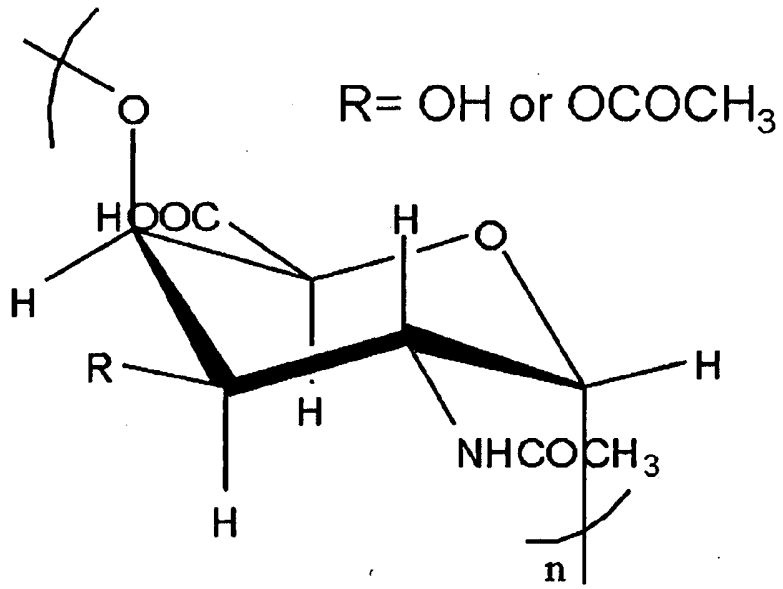


FIGURA 2

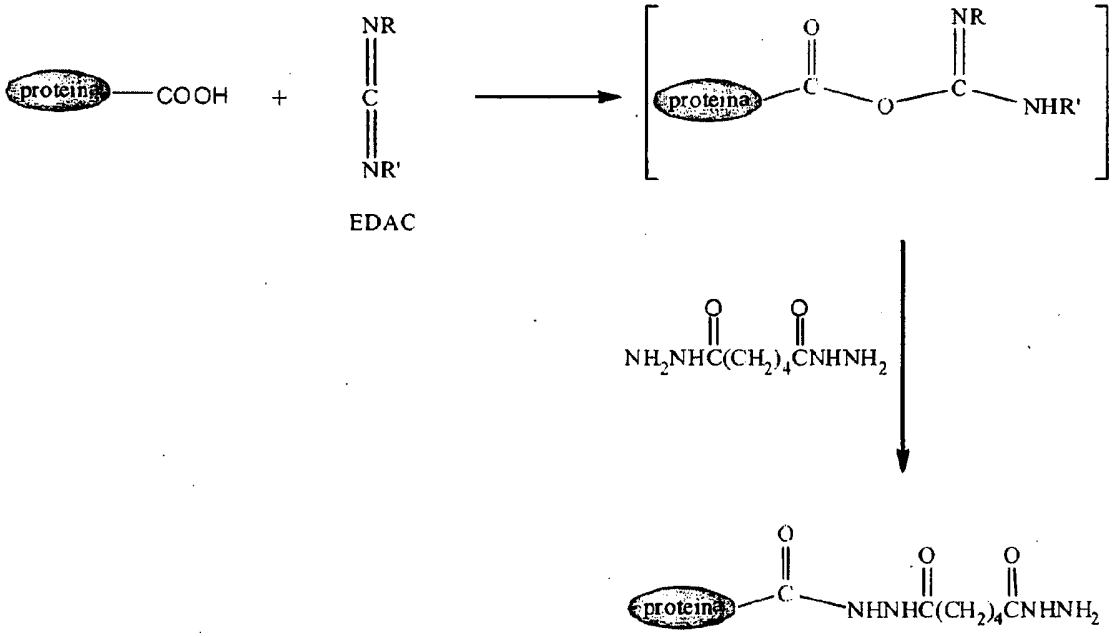


FIGURA 3

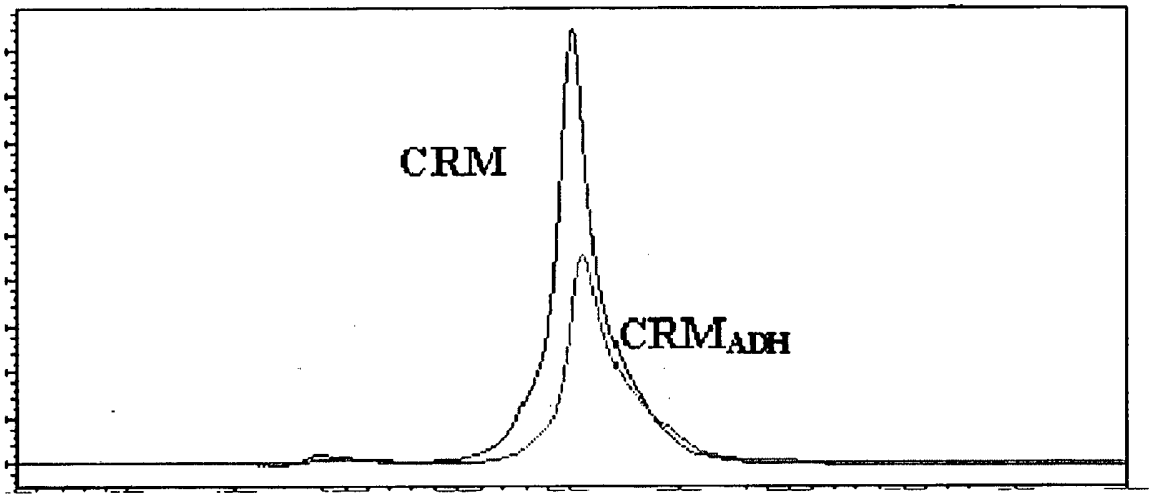


FIGURA 4

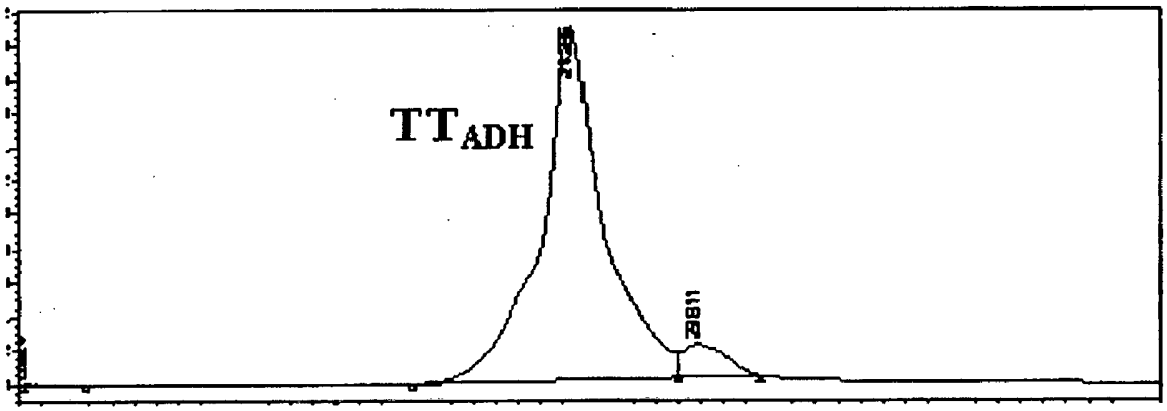


FIGURA 5

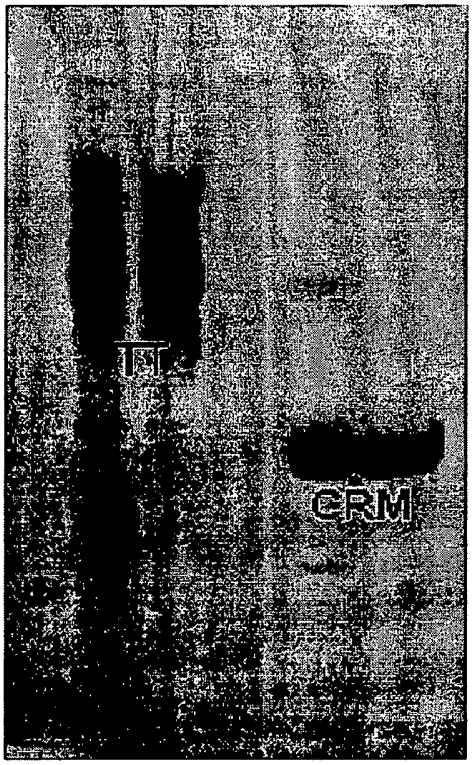


FIGURA 6

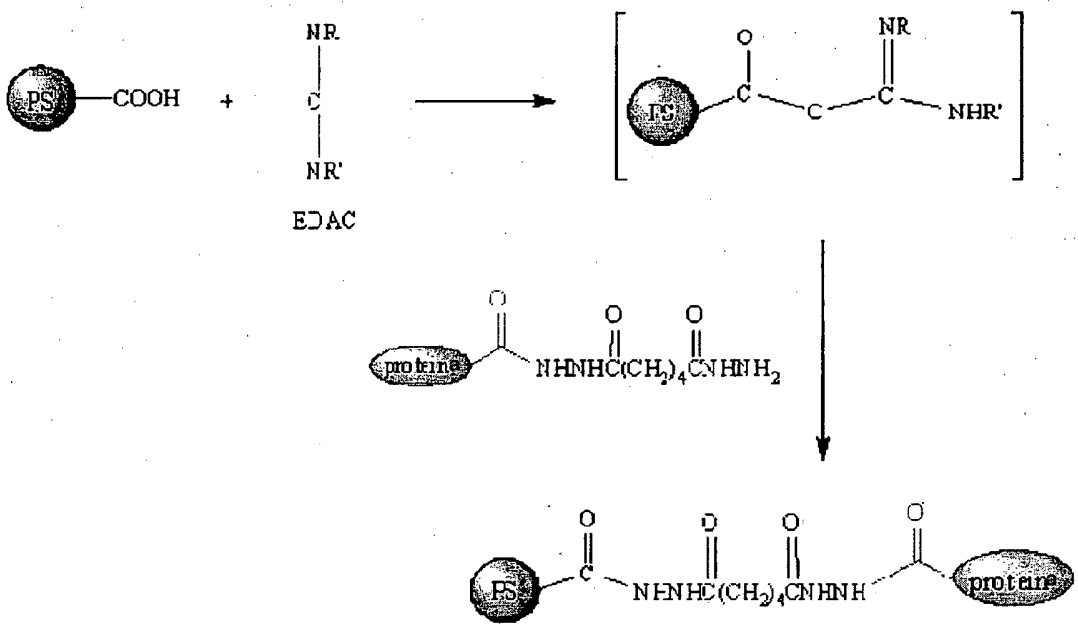


FIGURA 7

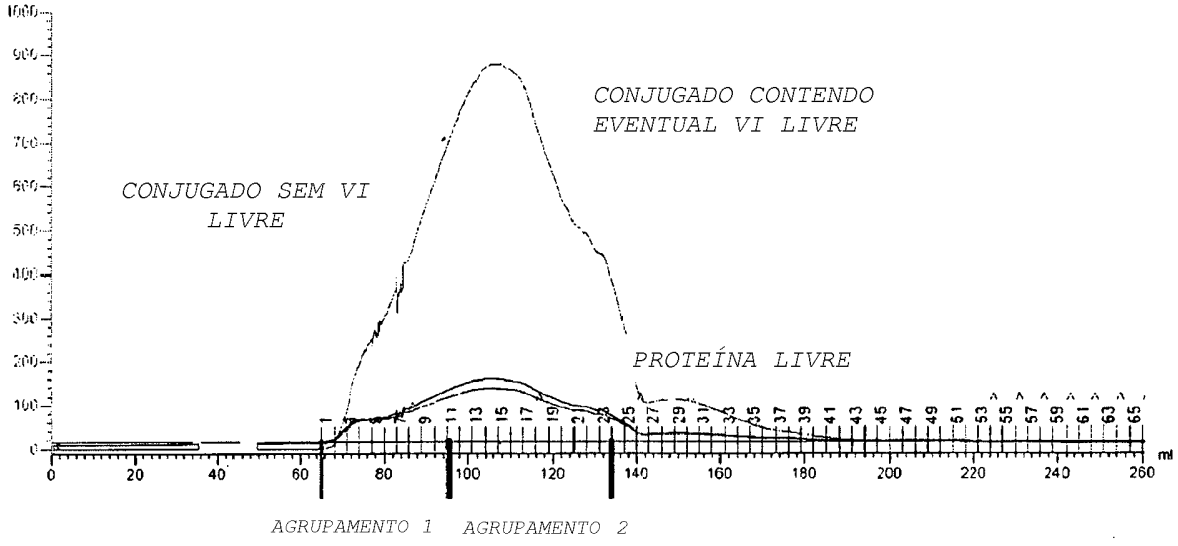


FIGURA 8

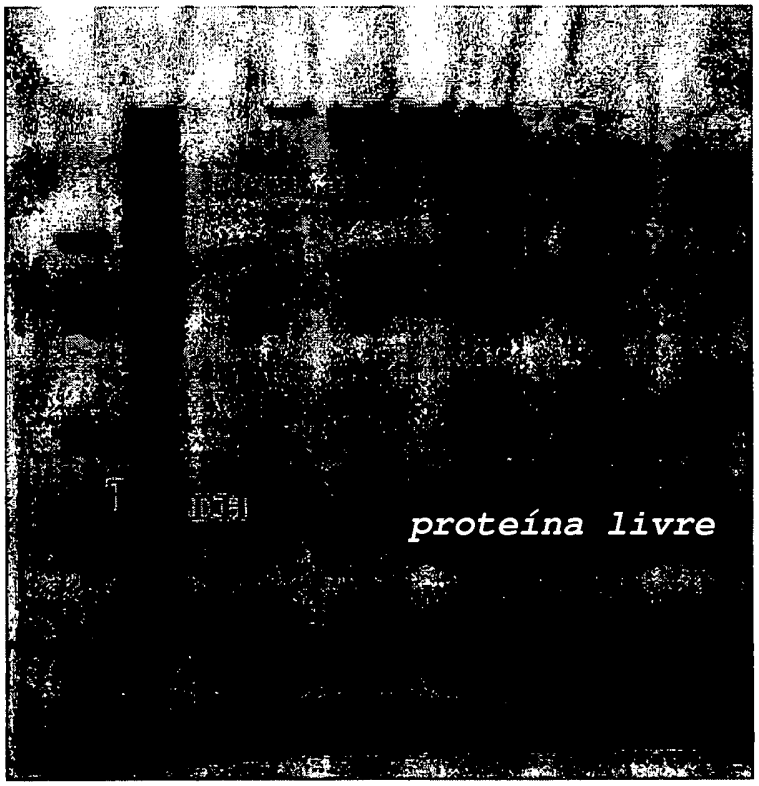


FIGURA 9

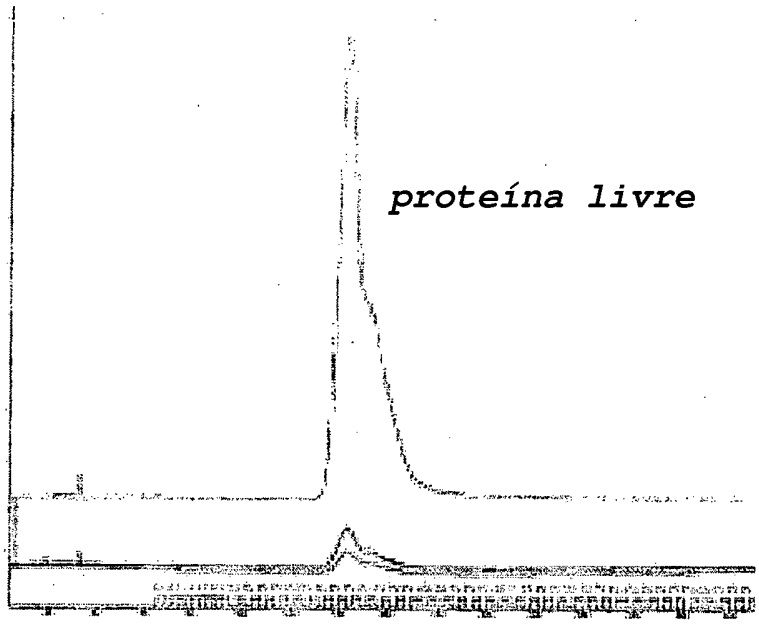


FIGURA 10

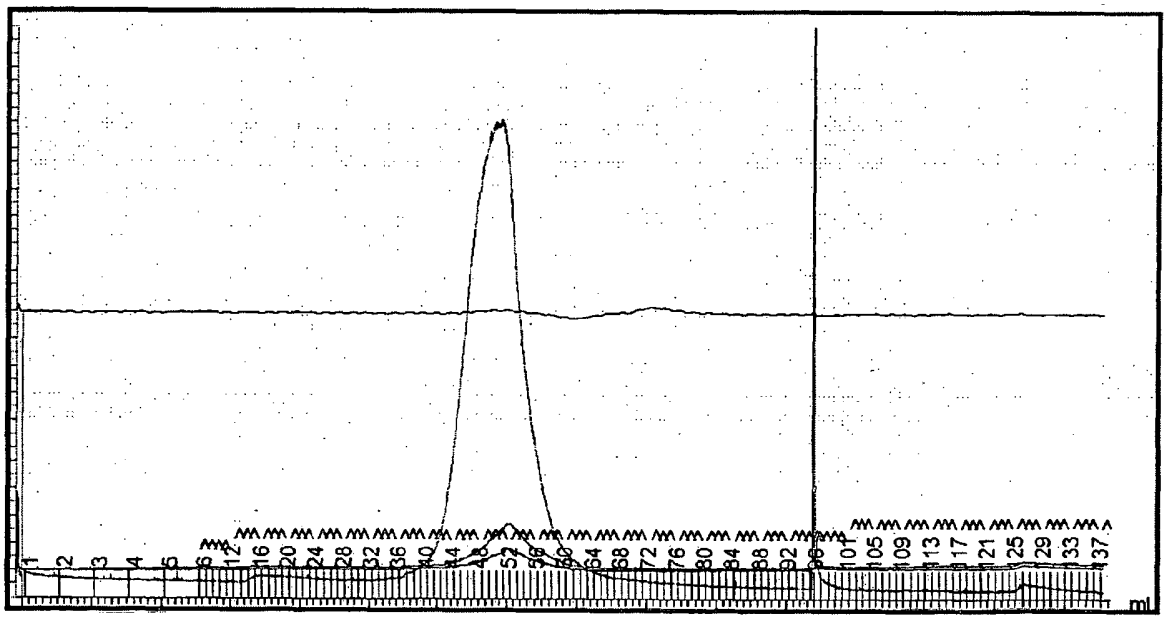


FIGURA 11

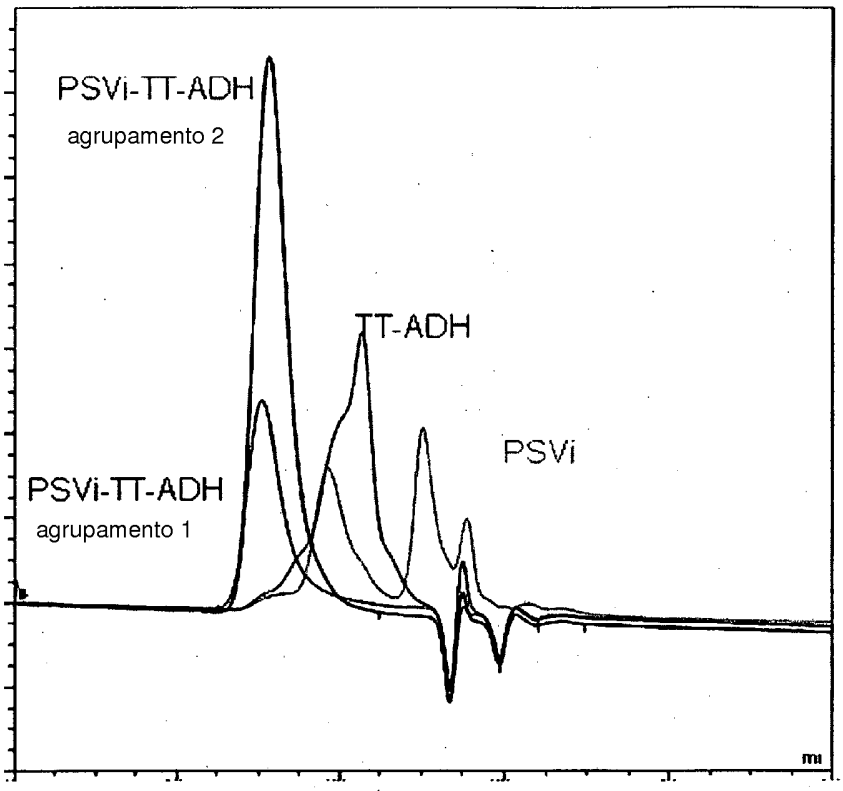


FIGURA 12

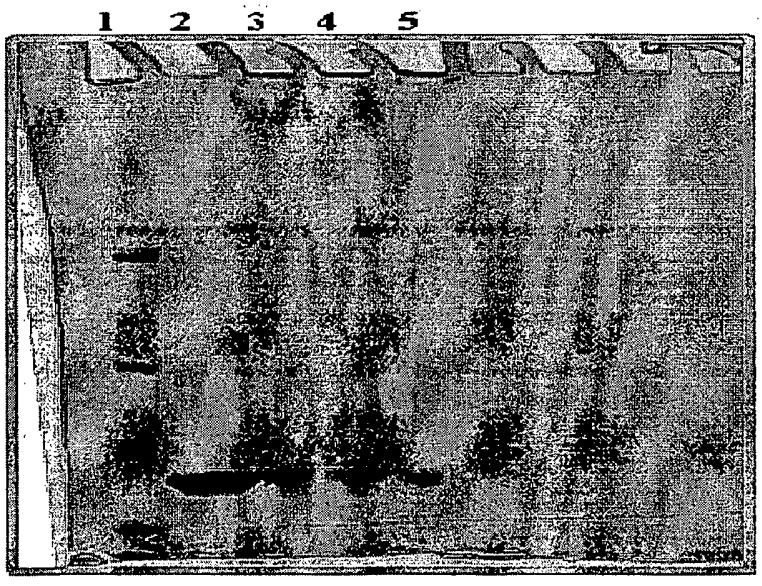


FIGURA 13

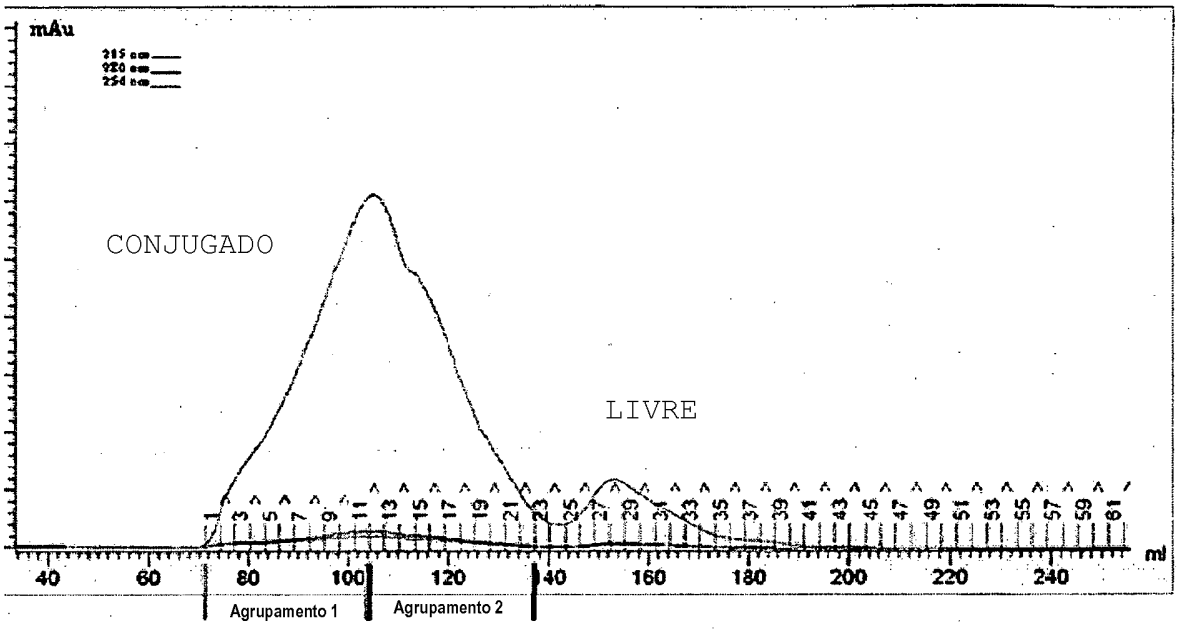


FIGURA 14

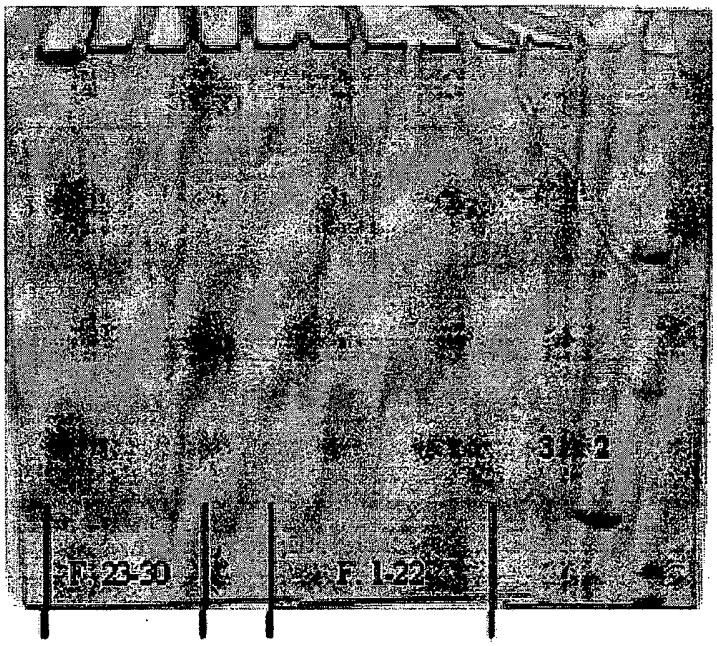


FIGURA 15

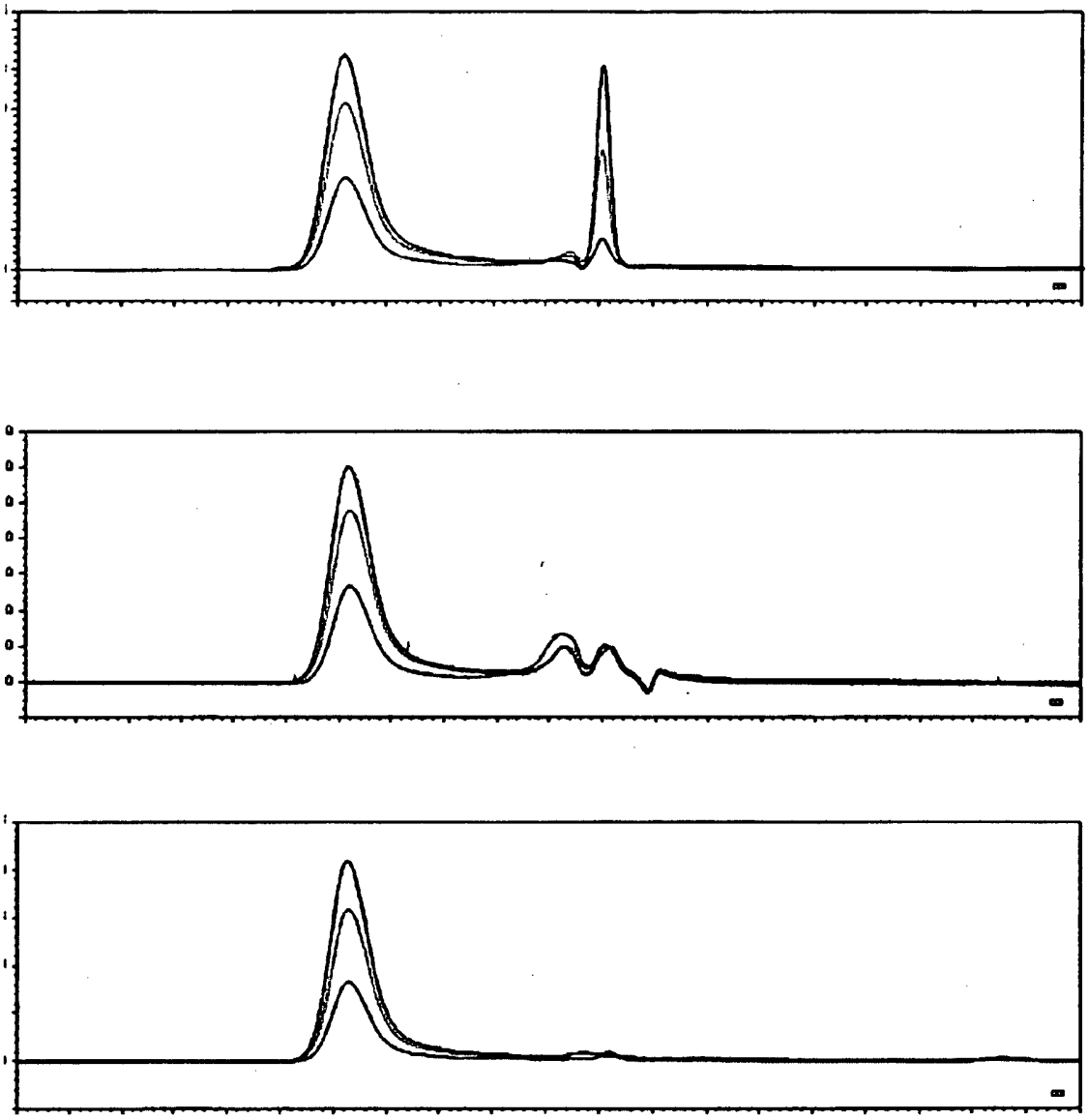


FIGURA 16

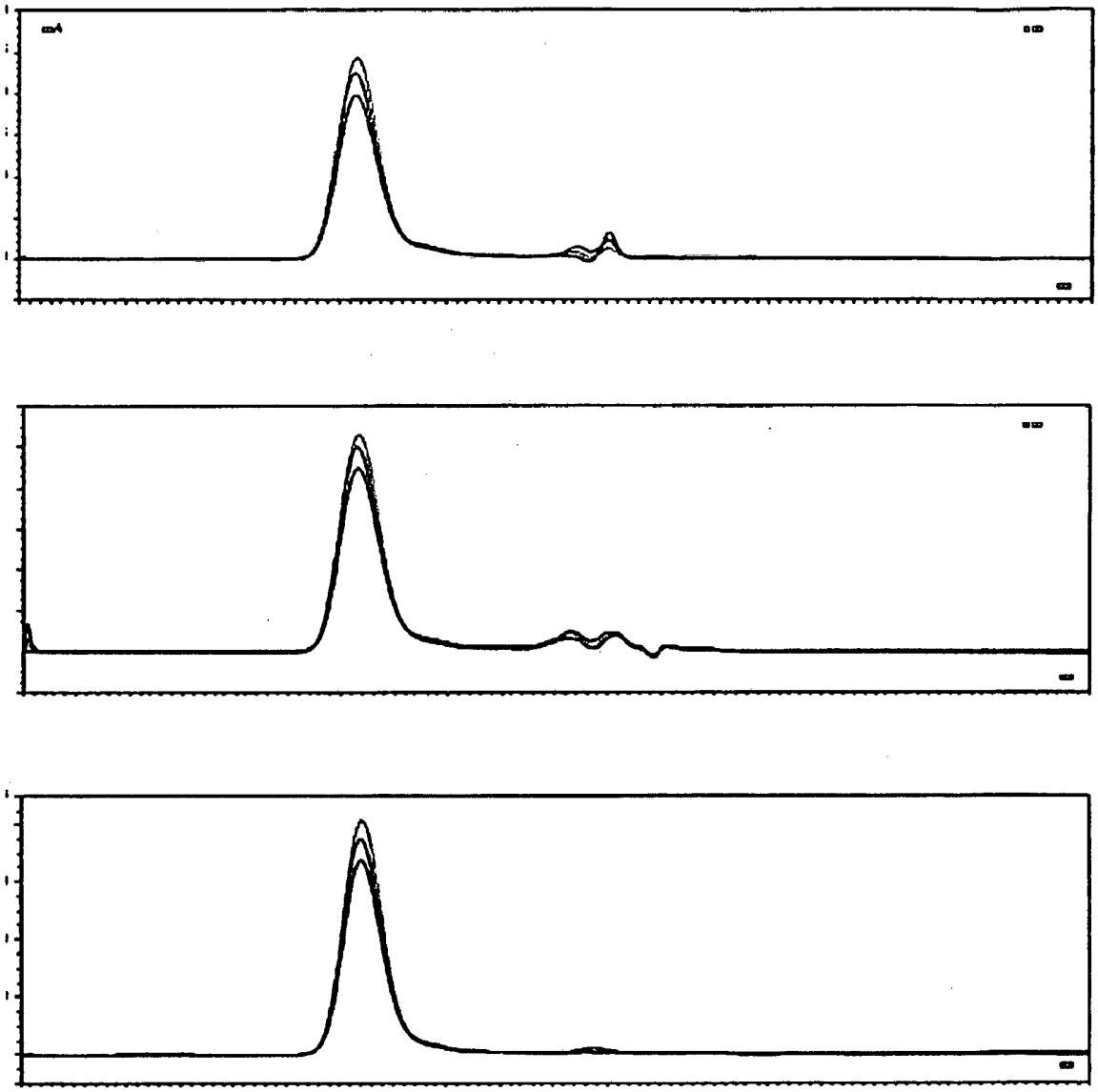


FIGURA 17

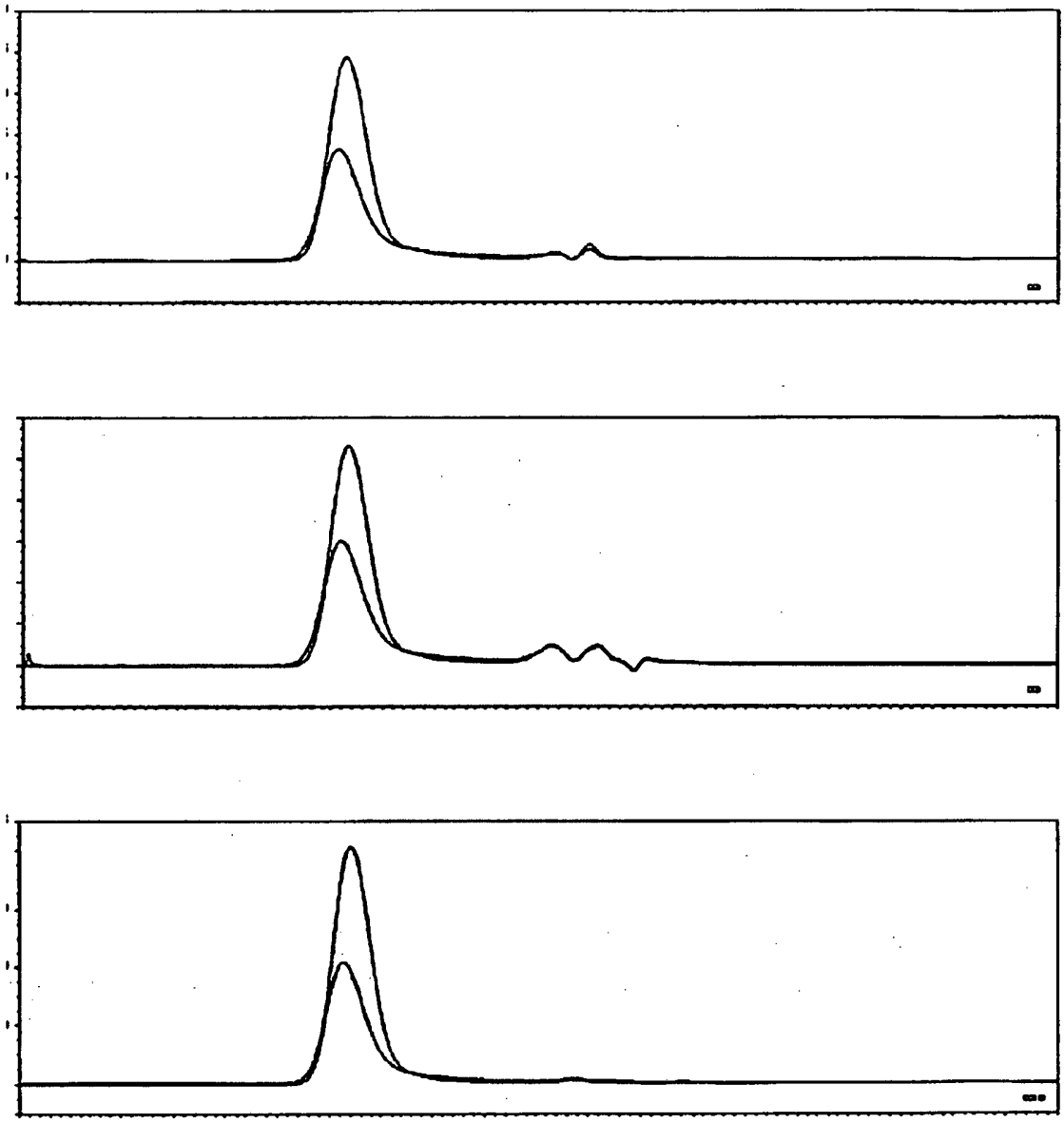


FIGURA 18

FIGURA 18A

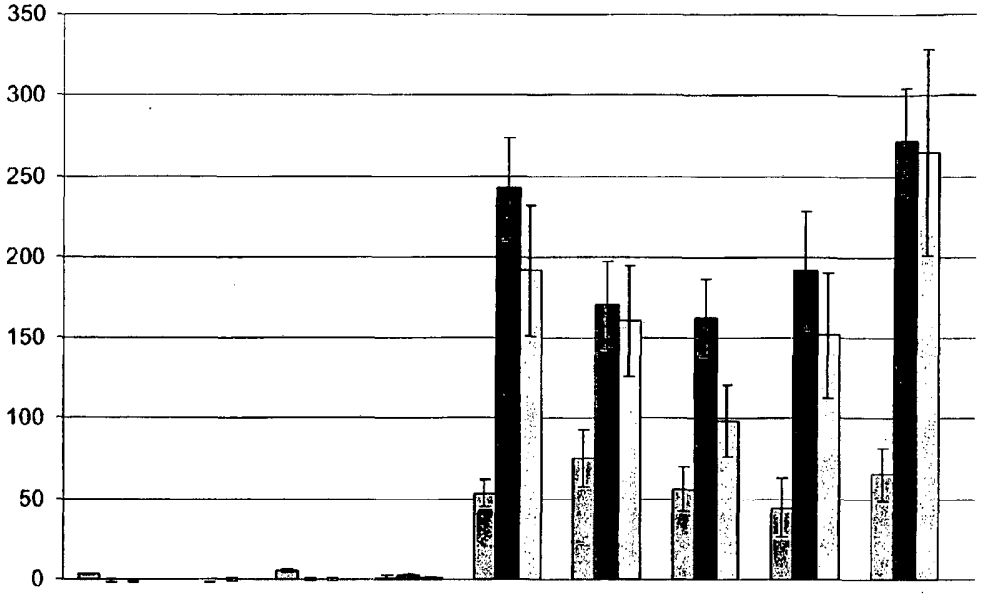
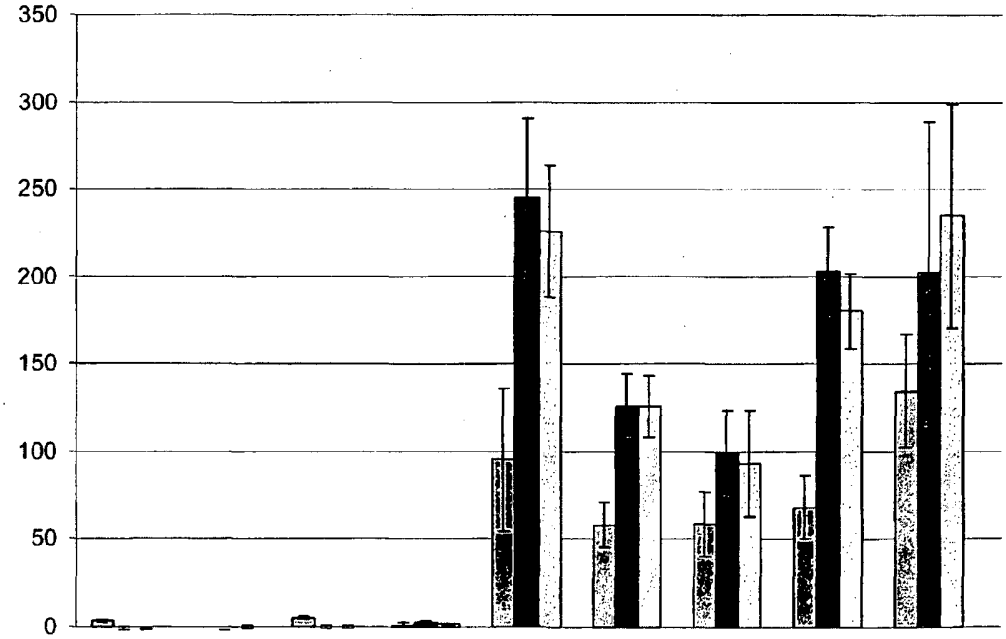



FIGURA 18B