



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720738-7 A2



(22) Data de Depósito: 14/12/2007
(43) Data da Publicação: 14/01/2014
(RPI 2245)

(51) Int.Cl.:
A61K 47/48
A61K 39/085
A61P 31/04

(54) Título: COMPOSIÇÃO DE CONJUGADO DE
POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA PNEUMOCÓCICO
MULTIVALENTE

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2006 US 11/644,095

(73) Titular(es): Wyeth

(72) Inventor(es): A. Krishna Prasad, George Rainer Siber, Peter
R. Paradiso, William P. Hausdorff

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007087524 de
14/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/079732de
03/07/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO DE CONJUGADO DE POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA PNEUMOCÓCICO MULTIVALENTE**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se de modo geral ao campo da medicina, e especificamente a microbiologia, imunologia, vacinas e à prevenção de infecção por um patógeno bacteriano por imunização.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 *Streptococcus pneumoniae* é uma causa importante de meningite, pneumonia, e doença invasiva grave em bebês e crianças pequenas em todo o mundo. As vacinas multivalentes de polissacarídeos pneumocócicos têm sido licenciadas por muitos anos e se comprovaram valiosas para prevenir doença pneumocócica em adultos idosos e pacientes de alto risco. No
15 entanto, bebês e crianças pequenas respondem pobremente à maioria dos polissacarídeos pneumocócicos. A vacina de conjugado pneumocócico hepta-valente (7vPnC, Prevnar®) foi a primeira deste tipo que se demonstrou ser altamente imunogênica e eficaz contra doença invasiva e otite média em bebês e crianças pequenas. Esta vacina é atualmente aprovada em muitos países em todo o mundo. Prevnar contém os polissacarídeos capsulares dos
20 sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, cada conjugado a uma proteína de veículo designado CRM₁₉₇. Prevnar cobre cerca de 80 a 90%, 60 a 80%, e 40 a 80% das doenças pneumocócicas invasivas (IPD) nos Estados Unidos, na Europa, e em outras regiões do mundo, respectivamente [1,2]. Dados de vigilância obtidos nos anos seguintes à introdução de Prevnar demonstraram
25 claramente uma redução da doença pneumocócica invasiva em bebês nos Estados Unidos conforme esperado (figura 1) [3,4].

A vigilância de doenças pneumocócicas invasivas conduzida em bebês nos Estados Unidos antes da introdução de Prevnar demonstrou que uma porção significativa de doença devida aos sorogrupos 6 e 19 foi devida
30 aos sorotipos 6A (aproximadamente um terço) e 19A (aproximadamente um quarto) [5,6]. A vigilância de doenças pneumocócicas invasivas conduzida nos Estados Unidos depois do licenciamento de Prevnar sugere que uma

grande carga de doença ainda é atribuível aos sorotipos 6A e 19A (figura 1) [3]. Além disso, estes dois sorotipos são responsáveis pela maioria dos casos de doença invasiva do que os sorotipos 1, 3, 5, e 7F combinados (8,2 vs. 3,3 casos/ 100.000 crianças de 2 anos e menos). Além disso, os sorotipos 6A e 19A estão associados com altas taxas de resistência a antibiótico (figura 2) [7,8,9]. Apesar de ser possível que a proteção cruzada contra o sorogrupo venha a resultar em um declínio da doença pelo sorotipo 6A e 19A à medida que mais crianças são imunizadas, há evidência sugerindo que haverá um limite para o declínio, e uma significativa carga de doença devida a estes sorotipos permanecerá (vide abaixo).

Dada a relativa carga e a importância de doença pneumocócica invasiva devida aos sorotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, e 19A, a adição destes sorotipos à formulação de Prevnar aumentaria a cobertura para doença invasiva até >90% nos Estados Unidos e Europa, e tão elevada quanto 70% a 80% na Ásia e na América Latina. Esta vacina expandiria significativamente a cobertura além da vacina Prevnar, e proporcionaria cobertura para 6A e 19A que não é dependente das limitações de proteção cruzada do sorogrupo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Por conseguinte, a presente invenção proporciona geralmente uma composição imunogênica multivalente compreendendo 13 conjugados de polissacarídeo-proteína distintos, em que cada um dos conjugados contém um capsular polissacarídeo de um sorotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a uma proteína de veículo, junto com um veículo fisiologicamente aceitável. Opcionalmente, um adjuvante, tal como um adjuvante à base de alumínio, é incluído na formulação. Mais especificamente, a presente invenção proporciona uma composição de conjugado pneumocócico 13-valente (13vPnC) compreendendo os sete sorotipos na vacina 7vPnC (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) mais seis sorotipos adicionais (1, 3, 5, 6A, 7F e 19A).

A presente invenção também proporciona uma composição imunogênica multivalente, em que os polissacarídeos capsulares são dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F de *Streptococcus pneumoniae* e a proteína de veículo é CRM₁₉₇.

A presente invenção proporciona adicionalmente uma composição imunogênica multivalente, em que os polissacarídeos capsulares são dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9v, 14, 18C, 19A, 19F e 23F de *Streptococcus pneumoniae*, a proteína de veículo é CRM₁₉₇, e o adjuvante é um adjuvante à base de alumínio, tal como fosfato de alumínio, sulfato de alumínio e hidróxido de alumínio. Em uma modalidade particular da invenção, o adjuvante é fosfato de alumínio.

A presente invenção também proporciona uma composição imunogênica multivalente, compreendendo conjugados de polissacarídeo-proteína junto com um veículo fisiologicamente aceitável, em que cada um dos conjugados compreende um polissacarídeo capsular de um sorotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a uma proteína de veículo, e os polissacarídeos capsulares são preparados a partir do sorotipo 3 e no mínimo um sorotipo adicional.

Em uma modalidade desta composição imunogênica multivalente, o sorotipo adicional é selecionado entre o grupo consistindo dos sorotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, e 23F. Em outra modalidade, a proteína de veículo é CRM₁₉₇. Em ainda outra modalidade, a composição compreende um adjuvante, tal como um adjuvante à base de alumínio selecionado entre fosfato de alumínio, sulfato de alumínio e hidróxido de alumínio. Em uma modalidade particular, o adjuvante é fosfato de alumínio.

A presente invenção também proporciona uma composição imunogênica multivalente, compreendendo conjugados de polissacarídeo-proteína junto com um veículo fisiologicamente aceitável, em que cada um dos conjugados compreende um polissacarídeo capsular de um sorotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a uma proteína de veículo, e os polissacarídeos capsulares são preparados a partir dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F e no mínimo um sorotipo adicional.

Em uma modalidade desta composição imunogênica multivalente, o sorotipo adicional é selecionado entre o grupo consistindo em sorotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, e 19A. Em outra modalidade, a proteína de veículo é CRM₁₉₇. Em ainda outra modalidade, a composição compreende um adjuvante, tal

como um adjuvante à base de alumínio selecionado entre fosfato de alumínio, sulfato de alumínio e hidróxido de alumínio. Em uma modalidade particular, o adjuvante é fosfato de alumínio.

5 A presente invenção também proporciona um método para induzir uma reação imune para um conjugado de polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae*, compreendendo administrar a um humano uma quantidade imunologicamente eficaz de quaisquer das composições imunogênicas descritas.

10 A presente invenção proporciona adicionalmente que quaisquer das composições imunogênicas administradas é uma única dose de 0,5 mL formulada para conter: 2 µg de cada sacarídeo, exceto por 6B a 4 µg; aproximadamente 29 µg CRM₁₉₇ proteína de veículo; 0,125 mg de adjuvante de alumínio elemental (0,5 mg de fosfato de alumínio); e tampão de cloreto de sódio e succinato de sódio como excipientes.

15 Também são proporcionados métodos para produzir um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A (Pn 19A) encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo. Em uma modalidade, o método compreende (i) reagir polissacarídeo sorotipo 19A purificado com um agente oxidante resultando em um
20 polissacarídeo sorotipo 19A ativado; (ii) combinar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado com uma proteína de veículo; (iii) coliofilizar o o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo; (iv) ressuspender o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo em dimetil sulfóxido (DMSO); (v) reagir o polissacarídeo sorotipo 19A ativado
25 combinado e proteína de veículo com um agente redutor resultando em um conjugado de polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo; e (vi) rematar aldeídos não reagidos no conjugado de polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo resultando em um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A encadeado de
30 modo covalente a uma proteína de veículo.

Em uma modalidade adicional, o método para produzir um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus*

pneumoniae sorotipo 19A encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo compreende (i) reagir polissacarídeo sorotipo 19A purificado com periodato de sódio resultando em um polissacarídeo sorotipo 19A ativado; (ii) ajustar o pH do polissacarídeo sorotipo 19A ativado para $6,5 \pm 0,2$; (iii) 5 combinar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado com sucrose; (iv) combinar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado com uma proteína de veículo CRM₁₉₇ em uma proporção de 0,8:1; (v) coliofilizar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo; (vi) ressuspender o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo em DMSO; (vii) reagir 10 o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo com cianoborideto de sódio resultando em um conjugado de polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo; e (viii) rematar aldeídos não reagidos no conjugado de polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo com borideto de sódio resultando em um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo. 15

Também são proporcionados métodos para produzir um conjugado imunogênico compreendendo um polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo no 20 qual o polissacarídeo compreende uma ligação fosfodiéster entre unidades de repetição. Em uma modalidade, o método compreende (i) reagir o polissacarídeo com um agente oxidante resultando em um polissacarídeo ativado; (ii) combinar o polissacarídeo ativado com uma proteína de veículo; (iii) coliofilizar o polissacarídeo ativado e proteína de veículo combinados; (iv) 25 ressuspender o polissacarídeo ativado e proteína de veículo combinados em DMSO; (v) reagir o polissacarídeo ativado e proteína de veículo combinados com um agente redutor resultando em um conjugado de polissacarídeo : proteína de veículo; e (vi) rematar aldeídos não reagidos no conjugado de polissacarídeo : proteína de veículo resultando em um conjugado de imunogênico 30 compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo. Em modalidades adicionais de semelhantes métodos, o polissacarídeo compreendendo uma ligação fos-

fodiéster entre unidades de repetição é polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A, 19F, 6A, ou 6B. Em uma modalidade adicional, a proteína de veículo é CRM₁₉₇.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

5 A figura 1 representa as alterações na taxa de doenças pneumocócicas invasivas por sorotipo em crianças dos Estados Unidos <2 anos de idade a partir da linha basal (1998/1999) até 2001.

A figura 2 representa a distribuição de isolados pneumocócicos com resistência a penicilina (PCN) em crianças <5 anos de idade (1998).

10 A figura 3 representa as curvas de distribuição cumulativa reversa (RCDC) de resultados de OPA pós-terceira dose da prova de D118-P16 Pevnar.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Inclusão dos Sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F de Pevnar

15 Dados de vigilância de doenças pneumocócicas invasivas entre 1995 e 1998 estimaram que os sete sorotipos Pevnar foram responsáveis por cerca de 82% das doenças pneumocócicas invasivas em crianças <2 anos de idade [5]. No Norte da Califórnia, o local da prova de eficácia, os sorotipos da Pevnar são responsáveis por 90% de todos os casos de doenças pneumocócicas invasivas IPD em bebês e crianças pequenas [10]. Desde a introdução da vacina Pevnar em 2000, houve uma significativa redução nas taxas globais de doenças pneumocócicas invasivas devido a uma redução na doença devida aos sorotipos da vacina [3,4]. Portanto, não há justificativa no momento para remover quaisquer dos sorotipos de Pevnar da próxima geração de vacinas de conjugados pneumocócicos mas sim de adicionar sorotipos para obter cobertura mais ampla.

20

25

Inclusão dos Sorotipos 1, 3, 5 e 7F

Nos Estados Unidos, a taxa de doenças pneumocócicas invasivas causadas pelo sorotipo 1 em crianças abaixo da idade de 5 anos é <2%, cerca da mesma que para cada um dos tipos 3 e 7F [1,6]. Os sorotipos 1 e 5 são responsáveis por taxas maiores de IPD em populações dos Estados Unidos em alto risco para doença pneumocócica invasiva. Especificamente, o sorotipo 1 causa 3,5% das doenças pneumocócicas invasivas em crianças

30

nativas do Alasca <2 anos de idade, e 18% em crianças de 2 a 4 anos de idade [11]. Tanto o sorotipo 1 quanto o sorotipo 5 causam significativamente doença em outras partes do mundo e em populações indígenas em países desenvolvidos [12,13,14].

5 O sorotipo 1 também pode ser associado com doença mais grave comparada com outros sorotipos pneumocócicos [15]. Esta observação se baseia na diferença nas taxas de identificação de caso entre os Estados Unidos e a Europa, e a diferença associada na prática médica. Globalmente, a incidência de doenças pneumocócicas invasivas é menor na Europa do
10 que nos Estados Unidos. No entanto, a percentagem de doenças pneumocócicas invasivas causados pelo sorotipo 1 na Europa é desproporcionalmente maior do que nos Estados Unidos (6 a 7%, vs. 1 a 2%, respectivamente). Na Europa, são obtidas culturas de sangue predominantemente de crianças hospitalizadas. Nos Estados Unidos, é prática da rotina médica obter
15 culturas de sangue em um ambiente ambulatorial de crianças apresentando febre $\geq 39^{\circ}\text{C}$ e contagens de leucócitos elevadas. Dada a diferença na prática médica, postulou-se que a menor percentagem de doenças causadas pelo sorotipo 1 nos Estados Unidos pode ser diluída pelas maiores taxas de outros sorotipos causando doença mais branda, ao passo que a maior percentagem na Europa reflete doença mais grave. Além disso, estudos de se-
20 roepidemiologia de crianças com complicações de pneumonia demonstram que o sorotipo 1 é representado desproporcionalmente [16,17,18]. Isto sugere que a inclusão do sorotipo 1 pode reduzir a quantidade de doença pneumocócica grave bem como contribuir para uma redução total na doença
25 pneumocócica invasiva.

 A adição dos sorotipos 3 e 7F aumenta a cobertura contra doença pneumocócica invasiva na maioria das áreas do mundo por aproximadamente 3% a 7%, e na Ásia em torno de 9%. Portanto, uma vacina 11-valente cobriria 50% na Ásia e em torno de 80% das doenças pneumocócicas inva-
30 sivas em todas as outras regiões [1,2]. Estes sorotipos também são importantes com respeito à cobertura contra otite média [19]. Em um estudo multinacional de sorotipos pneumocócicos causando otite média, Hausdorff et al.

descobriram que o sorotipo 3 é o 8º isolado mais comum do fluido do ouvido médio global [20]. O sorotipo 3 é responsável por até 8,7% dos sorotipos pneumocócicos associados com a otite média. Portanto, a importância dos tipos 3 e 7F na otite média, bem como em doenças pneumocócicas invasivas, garante sua inclusão em uma vacina de conjugado pneumocócico.

No entanto, tentativas de produzir uma vacina de conjugado pneumocócico multivalente que apresente imunogenicidade significativa com respeito aos polissacarídeos do sorotipo 3 não têm tido êxito. Por exemplo, em um estudo da imunogenicidade e segurança de uma vacina de conjugado pneumocócico de proteína D 11-valente (11-Pn-PD), não foi observado efeito de *iniciador* para o sorotipo 3 em bebês que tinham recebido três doses da vacina seguidas por uma dose de reforço ou da mesma vacina ou de uma vacina de polissacarídeos pneumocócicos (Nurkka et al. (2004) *Ped. Inf. Dis. J.*, 23: 1008-1014). Em outro estudo, resultados da prova opsonofagocítica (OPA) de bebês que tinham recebido doses de 11-Pn-PD não apresentaram reações de anticorpos para o sorotipo 3 em níveis comparáveis a outros sorotipos testados (Gatchalian et al., 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), Poster Nº 4, P1A Poster Session 1, Istambul Turquia, Mar. 27, 2001). Em ainda outro estudo, o qual avaliou a eficácia de uma 11-Pn-PD na prevenção de otite média aguda, a vacina não proporcionou proteção contra episódios causados pelo sorotipo 3 (Prymula et al. (2006) *Lancet*, 367: 740-748). Por conseguinte, uma vacina de conjugado pneumocócico compreendendo polissacarídeos capsulares do sorotipo 3 e capaz de provocar uma resposta imunogênica para polissacarídeos do sorotipo 3 proporciona um aprimoramento significativo em relação ao estado da técnica existente.

Inclusão dos Sorotipos 6A e 19A

a. Epidemiologia dos Sorotipos 6A e 19A

Dados de vigilância na literatura sugerem que os sorotipos 6A e 19A são responsáveis por mais doença pneumocócica invasiva nos Estados Unidos em crianças <2 anos de idade do que os sorotipos 1, 3, 5, e 7F combinados (figura 1) [1,5]. Além disso, estes sorotipos são comumente associados com resistência a antibiótico (figura 2) e têm um papel importante na otite média

[6,19,20]. A capacidade da vacina Prevnar corrente para proteger contra doença devido a 6A e 19A não está clara. O fundamento lógico para inclusão dos componentes 6A e 19A em uma vacina 13vPnC é discutido abaixo.

b. Respostas a 6A e 19A Induzidas pelos Polissacarídeos 6B e 19F

5 As vacinas de polissacarídeos pneumocócicos não conjugados licenciadas (para uso em pessoas com no mínimo dois anos de idade) continham polissacarídeo capsular 6A ou 6B mas não ambos [21]. Dados da imunogenicidade gerada por ocasião da formulação da vacina de polissacarídeos pneumocócicos 23-valente demonstraram que uma vacina 6B monovalente induziu anticorpo tanto para as cápsulas 6A quanto 6B. Os dados de 10 vários experimentos avaliando respostas de IgG e de prova opsonofagocítica (OPA) em uma variedade de populações com vacinas de polissacarídeo livre e com conjugados pneumocócicos sugeriram que reações de IgG para 6A são induzidas por antígenos 6B, mas as reações são geralmente menores, e 15 a atividade da OPA com organismos 6A é diferente de com organismos 6B [22,23,24,25]. Além disso, sujeitos respondendo com anticorpo 6B elevado podem ter pouca ou nenhuma atividade contra 6A.

Em contraste com a composição química dos polissacarídeos capsulares 6A e 6B onde existe um alto grau de similaridade, as cápsulas 20 19A e 19F são bastante diferentes devido à presença de duas cadeias laterais adicionais no polissacarídeo 19A. Não de modo surpreendente, reações imunes medidas em voluntários humanos imunizados com vacina de polissacarídeo 19F mostraram que foram induzidas reações a 19F em 80% dos sujeitos, mas somente 20% dos sujeitos tiveram uma reação a 19A [26]. Do 25 mesmo modo também foram documentados baixos níveis de reações a OPA e IgG reativas cruzadas para o sorotipo 19A depois de imunização com o polissacarídeo 19F em experimentos com vacinas de conjugado [24,26].

Foram gerados dados internos sobre reações reativas cruzadas de OPA para 6A e 19A a partir do experimento de *bridging* 7vPnC (D118- 30 P16) conduzido nos Estados Unidos em bebês (figura 3). Estes estudos estão consistentes nos achados de outros, e demonstram indução de anticorpo funcional reativo cruzado para polissacarídeo 6A depois de imunização com

polissacarídeo 6B, embora em um nível menor, e muito pouco anticorpo funcional para 19A depois de imunização com 19F.

Impacto de Imunização contra 6B e 19F sobre 6A e 19A em Modelos Animais

Modelos animais foram usados para avaliar o potencial para proteção cruzada com imunização contra polissacarídeos. Em um modelo de otite média desenvolvida por Giebink et al., chinchilas foram imunizados com uma vacina de conjugado tetravalente de proteína da membrana externa (OMP) de polissacarídeos (contendo os sacarídeos 6B, 14, 19F, 23F) ou placebo [27]. Nesta prova pareceu haver alguma proteção cruzada para 6A; no entanto esta não atingiu importância estatística e o nível de proteção foi menor do que com 6B contra otite média. Neste mesmo modelo houve 100% de proteção contra otite média por 19F, mas somente 17% de proteção contra otite média por 19A.

Saeland et al. usaram soros de bebês imunizados com uma vacina de conjugado pneumocócico 8-valente e toxóide tetânico (contendo 6B e 19F) para imunizar passivamente camundongos antes de um estímulo intranasal com organismos 6A, em um modelo de infecção pulmonar [28]. Das 59 amostras de soro, 53% protegeram os camundongos contra bacteremia com 6B e 37% protected contra 6A. A camundongos imunizados passivamente com soros de bebês imunizados com quatro doses de uma vacina de conjugado pneumocócico 11-valente (contendo 19F conjugado a toxóide tetânico) foi administrados um estímulo intranasal com organismos 19A no mesmo modelo [29]. De 100 camundongos imunizados passivamente e em seguida estimulados, 60 camundongos não tiveram organismos 19A detectados em tecido pulmonar, ao passo que foram identificados organismos em todos os camundongos aos quais foi administrado placebo de salina. No entanto, a imunização passiva não protegeu contra estímulo com organismos 19F neste modelo; portanto, a relevância do modelo para o sorogroppo 19 é questionável. Em geral estes modelos proporcionam evidência de algum impacto biológico de imunização de 6B sobre organismos 6A embora o efeito sobre o sorotipo heterólogo não seja tão grande quanto o observado com o sorotipo homólogo. O impacto de imunização com 19F sobre organismos

19A não é bem entendido a partir destes modelos.

Impacto de Imunização de Conjugado de Polissacarídeos 6B e 19F sobre Doença por 6A e 19A em Provas de Eficácia / Efetividade

- O número de casos de doença devido aos sorotipos 6B, 6A, 19F e 19A em provas da eficácia de 7vPnC e 9vPnC (7vPnC mais sorotipos 1 e 5) é observado na Tabela 1 [30,10,31]. Os números de casos de doença invasiva são pequenos demais para permitir que quaisquer conclusões sejam deduzidas para os sorotipos 6A e 19A. No entanto, a prova de otite média finlandesa (*Finnish Otitis Media*) gerou um grande número de isolados pneumocócicos [32]. Na análise segundo o protocolo de 7vPnC foi 84% (95% CI 62%, 93%) eficaz contra otite média devido ao sorotipo 6B e 57% (95% CI 24%, 76%) eficaz contra otite média devida ao sorotipo 6A (Tabela 1). Em contraste, não foi demonstrada eficácia sorotipo-específico com a 7vPnC para otite média devida ou a 19F ou a 19A.
- Tabela 1.** Casos de Doença Pneumocócica Devida aos Sorotipos 6B, 6A, 19F, e 19A em Provas de Eficácia com as Vacinas 7vPnC e 9vPnC

	6B		6A		19F		19A	
	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.
Prova de Eficácia de Kaiser – 7vPnC (ITT)	1	7	0	1	2*	13	0	1
Prova de Eficácia de Navajo – 7vPnC (ITT)	0	5	1	0	1	1	1	0
Prova de Eficácia da África do Sul – 9vPnC HIV (-) (ITT)	1	2	1	0	0	1	3	1
Prova de Eficácia da África do Sul – 9vPnC HIV (+) (ITT)	1	7	3	10	2	3	2	3
Prova de Otite Média Finlandesa – 7vPnC (PP)	9*	56	19*	45	43	58	17	26

* Eficácia estatisticamente significativa demonstrada a partir das referências

30, 10 e 33, e comunicações pessoais

Contr = controle

ITT = análise da população alvo do tratamento (N.T.: com intenção de tratar)

PP = análise segundo o protocolo

5 Dados de vigilância de doenças pneumocócicas invasivas pós-comercialização também estão disponíveis a partir de uma prova de caso-controle conduzida pelos Centros para Controle de Doença para avaliar a eficácia de Prevnar [33]. Casos de doença pneumocócica invasiva ocorrendo em criança de 3 a 23 meses de idade foram identificados nos laboratórios de
10 vigilância e combinados com três casos controle por idade e código postal (*zip code*). Depois de obter consentimento, foi obtido o histórico médico e de imunização (os sujeitos foram considerados imunizados se tivessem recebido no mínimo uma dose de Prevnar) dos pais e dos provedores médicos para casos e controles. Os resultados preliminares foram apresentados no congresso
15 ICAAC de 2003 e um resumo dos achados para doença por 6B, 19F, 19A e 6A é apresentada na Tabela 2. Estes dados indicam que Prevnar tem a capacidade de prevenir doença devido a 6A, embora em um nível que pode ser um tanto menor do que doença pelo sorotipo 6B. Estes dados também indicam que é limitada a proteção cruzada para doença invasiva devido ao 19A.

20 Tabela 2. Resultados preliminares de uma Prova de Controle de Caso Realizada pelo CDC (apresentada no ICAAC, 2003)

Sorotipo	Séries Informativas, n	VE* (95% CI)
Tipo de Vacina, Todos	115	94 (87, 97)
Relacionado com a Vacina, Todos	36	70 (38, 86)
Tipo Não-Vacina, Todos	43	-4 (-106, 48)
6B	27	94 (72, 99)
19F	19	73 (16, 92)
6A	15	87 (53, 97)
19A	16	40 (-87, 80)

*Eficácia da vacina comparando vacinados (≥ 1 dose) vs. não vacinados, e ajustada para condições subjacentes

Referência 40 e comunicação pessoal / confidencial

Uma análise publicada [3] do uso de Prevnar também indicou que os sorotipos 6B e 19F conferiram uma redução moderada em doenças pneumocócicas invasivas causadas pelos sorotipos 6A e 19A entre crianças abaixo de dois anos de idade (Tabela 1 in [3]). As taxas de doença entre adultos não imunizados causada pelos sorotipos 6A, 9A, 9L, 9N, 18A, 18B, 18F, 19A, 19B, 19C, 23A e 23B ("todos os sorotipos relacionados com a vacina") foram um tanto reduzidas (Tabela 2 em [3]). Estes dados estabelecem que a imunidade da população do uso de Prevnar em crianças abaixo de dois anos de idade foi modesta para os sorotipos 6A e 19A, e proporcionam uma base para a inclusão dos sorotipos 6A e 19A na vacina 13vPnC desta invenção.

Conclusão para adição de 6A e 19A

Os dados de vigilância pós-comercialização e os resultados do estudo de caso-controle mencionados na figura 1 e Tabela 2 com a vacina 7vPnC sugerem que, consistente nas outras informações sobre reações imunes e performance nos modelos animais descritos acima, pode haver alguma proteção cruzada contra doença por 6A, mas em uma menor extensão do que para doença por 6B. Além disso, parece que a proteção contra 19A é limitada. Portanto, uma vacina 13vPnC contendo os sorotipos 6A e 19A proporciona cobertura que não é dependente das limitações da proteção cruzada do sorogrupo pelos sorotipos 6B e 19F.

Por conseguinte, a presente invenção proporciona uma composição imunogênica multivalente compreendendo 13 conjugados de polissacarídeo-proteína distintos, em que cada um dos conjugados contém um polissacarídeo capsular diferente conjugado a uma proteína de veículo, e em que os polissacarídeos capsulares são preparados a partir dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F de *Streptococcus pneumoniae*, junto com um veículo fisiologicamente aceitável. Uma proteína de veículo semelhante é o toxóide diftérico designado CRM₁₉₇. A composição imunogênica pode compreender adicionalmente um adjuvante, tal como um adjuvante à base de alumínio, tal como fosfato de alumínio, sulfato de alumínio e hidróxido de alumínio.

Polissacarídeos capsulares são preparados por técnicas de rotina de conhecimento dos versados na arte. Na presente invenção, polissacarídeos capsulares são preparados a partir dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F de *Streptococcus pneumoniae*. Estes conjugados de pneumocócicos são preparados por processos isolados e formulados em uma formulação de dosagem única. Por exemplo, em uma modalidade, cada sorotipo de polissacarídeos pneumocócicos é cultivado em um meio à base de soja. Os polissacarídeos individuais são em seguida purificados através de centrifugação, precipitação, ultrafiltração, e cromatografia de coluna. Os polissacarídeos purificados são quimicamente ativados para produzir os sacarídeos capazes de reagir com a proteína de veículo.

Uma vez ativado, cada polissacarídeo capsular é conjugado separadamente a uma proteína de veículo para formar um glicoconjugado. Em uma modalidade, cada polissacarídeo capsular é conjugado à mesma proteína de veículo. Nesta modalidade, a conjugação é realizada por aminação redutiva.

A ativação química dos polissacarídeos e subsequente conjugação à proteína de veículo são obtidas por meios convencionais. Vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nºs 4.673.574 e 4.902.506 [34,35].

Proteínas de veículo são preferencialmente proteínas que são não-tóxicas e não-reatogênicas e obteníveis em quantidade e pureza suficiente. Proteínas de veículo devem ser suscetíveis a procedimentos de conjugação padrão. Em uma modalidade particular da presente invenção, CRM₁₉₇ é usado como a proteína de veículo.

CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) é uma variante não-tóxica (isto é, toxóide) de toxina diftérica isolada de culturas de *Corynebacterium diphtheria* cepa C7 (β 197) cultivadas em ácidos casamino e meio à base de extrato de levedura. CRM₁₉₇ é purificado através de ultrafiltração, precipitação de sulfato de amônio, e cromatografia de permuta iônica. Alternativamente, CRM₁₉₇ é preparado de modo recombinante de acordo com a Patente dos Estados Unidos Nº 5.614.382, a qual é por este incorporada por meio de referência. Outros toxóides diftéricos também são adequados para uso como proteínas

de veículo.

Outras proteínas de veículo adequadas incluem toxinas bacterianas inativadas tais como toxóide tetânico, toxóide pertussis, toxóide do cholera (por exemplo, conforme descrito no Requerimento de Patente Internacional Nº WO2004/083251 [38]), *E. coli* LT, *E. coli* ST, e exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Também podem ser usadas proteínas da membrana externa bacteriana tais como complexo c da membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de ligação de transferrina, pneumolisina, proteína A da superfície pneumocócica (PspA), proteína adesina pneumocócica (PsaA), C5a peptidase de estreptococos do Grupo A ou Grupo B, ou proteína D de *Haemophilus influenzae*. Outras proteínas, tais como ovalbumina, hemocianina de *keyhole limpet* (KLH), albumina sérica bovina (BSA) ou proteína purificada derivada de tuberculina (PPD) também podem ser usadas como proteínas de veículo.

Depois de conjugação do polissacarídeo capsular à proteína de veículo, os conjugados de polissacarídeo-proteína são purificados (enriquecidos com respeito à quantidade de conjugado de polissacarídeo-proteína) por uma variedade de técnicas. Estas técnicas incluem operações de concentração / diafiltração, precipitação / elutriação, cromatografia de coluna, e filtração de profundidade. Vide os exemplos abaixo.

Depois dos glicoconjugados individuais serem purificados, são combinados para formular a composição imunogênica da presente invenção, a qual pode ser usada como uma vacina. Formulação da composição imunogênica da presente invenção pode ser realizada usando métodos conhecidos na arte. Por exemplo, os 13 conjugados pneumocócicos individuais podem ser formulados com um veículo fisiologicamente aceitável para preparar a composição. Exemplos de semelhantes veículos incluem, mas não estão limitados a, água, salina tamponada, polióis (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido) e soluções de dextrose.

Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreenderá um ou mais adjuvantes. Conforme definido aqui, neste requerimento de patente, um "adjuvante" é uma substância que serve para reforçar a imunogenicidade de uma composição imunogênica desta invenção. Deste mo-

do, adjuvantes são frequentemente administrados para reforçar a reação imune e são de conhecimento geral do técnico versado. Adjuvantes adequados para reforçar a eficácia da composição incluem, mas não estão limitados a:

(1) sais de alumínio (alúmen), tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, e etc.;

(2) formulações de emulsão de óleo-em-água (com ou sem outros agentes imunoestimulantes específicos tais como peptídeos muramyl (definidos abaixo) ou componentes da parede celular bacteriana), tais como, por exemplo,

(a) MF59 (requerimento de patente internacional publicado PCT Nº WO 90/14837), contendo 5% de Squalene, 0,5% de Tween 80, e 0,5% de Span 85 (opcionalmente contendo várias quantidades de MTP-PE (vide abaixo, embora não requerido)) formuladas em partículas submicron usando um microfluidificador tal como microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA),

(b) SAF, contendo 10% de Squalene, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado com pluronic, e thr-MDP (vide abaixo) ou microfluidificado em uma emulsão submicron ou turbilhonado para gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior, e

(c) sistema adjuvante Ribi® (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) contendo 2% de Squalene, 0,2% de Tween 80, e um ou mais componentes da parede celular bacteriana entre o grupo consistindo em monofosforilípido A 3-O-deilado (MPL®) descrito na Patente dos Estados Unidos Nº 4.912.094 (Corixa), trealose dimicolato (TDM), e esqueleto da parede celular (CWS), preferencialmente MPL + CWS (Detox®);

(3) adjuvantes de saponina, tais como Quil A ou STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (Patente dos Estados Unidos Nº 5.057.540) podem ser usados ou partículas geradas a partir dos mesmos tais como ISCOMs (complexos imunoestimulantes);

(4) lipopolissacarídeos bacterianos, análogos sintéticos de lipídeo A tais como compostos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), ou derivados ou análogos dos mesmos, os quais estão disponíveis na Cori-

xa, e os quais são descritos na Patente dos Estados Unidos Nº 6.113.918; um AGP semelhante é 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Deóxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosídeo, o qual também é conhecido como 529 (conhecido anteriormente como RC529), o qual é formulado como uma forma aquosa ou como uma emulsão estável, polinucleotídeos sintéticos tais como oligonucleotídeos contendo um ou mais motivos CpG (Patente dos Estados Unidos Nº 6.207.646);

(5) citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, e etc.), interferons (por exemplo, gama interferon), fator estimulante de colônia de macrófagos granulócitos (GM-CSF), fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2, e etc.;

(6) mutantes detoxificados de uma toxina ADP-ribosilante bacteriana tal como uma toxina do cólera (CT) quer em uma forma selvagem ou mutante, por exemplo, onde o ácido glutâmico na posição de aminoácido 29 é substituído por outro aminoácido, preferencialmente uma histidina, de acordo com o Requerimento de Patente Internacional publicado Nº WO 00/18434 (vide também o Requerimento de Patente Internacional Nº WO 02/098368 e o Requerimento de Patente Internacional Nº WO 02/098369), uma toxina pertussis (PT), ou uma toxina termo lábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (vide, por exemplo, o Requerimento de Patente Internacional Nº WO 93/13302 e o Requerimento de Patente Internacional Nº WO 92/19265); e

(7) outras substâncias que agem como agentes imunoestimulantes para reforçar a eficácia da composição.

Peptídeos muramil incluem, mas não estão limitados a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforilóxi)-etilamina (MTP-PE), e etc.

As formulações de vacina da presente invenção podem ser usadas para proteger ou tratar um humano suscetível a infecção pneumocócica, por meio de administração da vacina através de uma via sistêmica ou muco-

sa. Estas administrações podem incluir injeção através das vias intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea; ou através de administração mucosa aos tratos oral / alimentar, respiratório ou genitourinário. Em uma modalidade, administração intranasal é usada para o tratamento de pneumonia ou otite média (uma vez que o transporte nasofaríngeo de pneumococos pode ser prevenido de modo mais eficaz, deste modo atenuando a infecção em seu estágio inicial).

A quantidade de conjugado em cada dose de vacina é selecionada como uma quantidade que induz uma reação imunoprotetora sem efeitos adversos significativos. A quantidade referida pode variar dependendo do sorotipo pneumocócico. Geralmente, cada dose compreenderá 0,1 a 100 µg de polissacarídeo, particularmente 0,1 a 10 µg, e mais particularmente 1 a 5 µg.

Quantidades ótimas de componentes para uma vacina particular podem ser determinadas por estudos de rotina envolvendo observação de reações imunes apropriadas em sujeitos. Depois de uma vacinação inicial, os sujeitos podem receber uma ou várias imunizações de reforço adequadamente espaçadas.

Em uma modalidade particular da presente invenção, a vacina 13vPnC é uma formulação líquida esteril de polissacarídeos capsulares pneumocócicos dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, e 23F individualmente conjugados a CRM₁₉₇. Cada dose de 0,5 mL é formulada para conter: 2 µg de cada sacarídeo, exceto por 6B a 4 µg; aproximadamente 29 µg de proteína de veículo CRM₁₉₇; 0,125 mg adjuvante de alumínio elemental (0,5 mg de fosfato de alumínio); e tampão de cloreto de sódio e succinato de sódio como excipientes. O líquido é enchido em seringas de dose única sem um preservante. Depois de agitar, a vacina é uma suspensão branca e homogênea pronta para administração intramuscular.

A escolha do nível de dose para a vacina 13vPnC é similar à vacina 7vPnC comercializada (Prevnar). O nível de dose de 2 µg de sacarídeo foi selecionado para todos os sorotipos, exceto para 6B, o qual é a 4 µg por dose. A vacina 7vPnC apresentou desejável segurança, imunogenicidade, e eficácia contra doença pneumocócica invasiva no nível de dose de 2

µg de sacarídeo para os sorotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, e na dose de 4 µg para 6B.

O esquema de imunização pode seguir o designado para a vacina 7vPnC. Por exemplo, o esquema de rotina para bebês e crianças começando a andar contra doença invasiva causada pelo *S. pneumoniae* devido aos sorotipos incluídos na vacina 13vPnC é 2, 4, 6 e 12 a 15 meses de idade. As composições desta invenção também são adequadas para uso com crianças maiores, adolescentes e adultos.

As composições desta invenção podem incluir adicionalmente um ou mais antígenos adicionais para uso contra otite média causada por infecção com outras bactérias. As bactérias referidas incluem *Haemophilus influenza* não tipável, *Moraxella catarrhalis* (conhecida anteriormente como *Branhamella catarrhalis*) e *Alloiococcus otitidis*.

Exemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* não tipável adequados para inclusão incluem a proteína P4, também conhecida como proteína "e" (Patente dos Estados Unidos Nº 5.601.831; o Requerimento de Patente Internacional Nº WO03/078453), a proteína P6, também conhecida como a proteína PAL ou a proteína PBOMP-1 (Patente dos Estados Unidos Nº 5.110.908; Requerimento de Patente Internacional Nº WO0100790), a proteína P5 (a Reemissão de Patente dos Estados Unidos Nº 37.741), a proteína de adesão e de penetração de *Haemophilus* (Patentes dos Estados Unidos Nºs 6.245.337 e 6.676.948), a proteína LKP tip adesina (Patente dos Estados Unidos Nº 5.643.725) e a proteína NucA (Patente dos Estados Unidos Nº 6.221.365).

Exemplos de antígenos de *Moraxella catarrhalis* adequados para inclusão incluem a proteína UspA2 (Patentes dos Estados Unidos Nºs 5.552.146, 6.310.190), a proteína CD (Patente dos Estados Unidos Nº 5.725.862), a proteína E (Patente dos Estados Unidos Nº 5.948.412) e a proteína da membrana externa de 74 quilodalton (Patente dos Estados Unidos Nº 6.899.885).

Exemplos de antígenos de *Alloiococcus otitidis* adequados para inclusão incluem os identificados no Requerimento de Patente Internacional

Nº WO03/048304.

As composições desta invenção também podem incluir uma ou mais proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Exemplos de proteínas de *Streptococcus pneumoniae* adequadas para inclusão incluem as identificadas no Requerimento de Patente Internacional Nº WO02/083855, bem como as descritas no Requerimento de Patente Internacional Nº WO02/053761.

As composições desta invenção podem incluir adicionalmente uma ou mais proteínas de *Neisseria meningitidis* tipo B. Exemplos de proteínas de *Neisseria meningitidis* tipo B adequadas para inclusão incluem as identificadas nos Requerimentos de Patente Internacional Nºs WO03/063766, WO2004/094596, WO01/85772, WO02/16612 e WO01/87939.

Processo de Coliofilização e Conjugação para Polissacarídeo de *S. pneumoniae* Sorotipo 19A

O sorotipo 19A é muito mais propenso a degradação térmica do que outros sorotipos de *S. pneumoniae* devido à presença de ligações fosfodiéster entre suas subunidades. De modo a melhorar a eficiência da conjugação e a controlar a estabilidade do polissacarídeo sorotipo 19A inerentemente lábil, um processo de coliofilização e conjugação na presença de dimetil sulfóxido (DMSO) é usado na conjugação do polissacarídeo sorotipo 19A à proteína de veículo CRM₁₉₇. Este processo proporciona características de conjugado aprimoradas em termos de tamanho molecular e da percentagem de sacarídeo livre para sorotipo 19A comparada ao uso de processos de conjugação envolvendo discreta liofilização de polissacarídeos e proteínas de veículo em DMSO ou processos envolvendo coliofilização aquosa de polissacarídeos e proteínas de veículo sem DMSO.

Conforme descrito em mais detalhes no Exemplo 17 abaixo, a conjugação do polissacarídeo sorotipo 19A à proteína de veículo, CRM₁₉₇, é um processo de duas etapas de reação. A primeira etapa envolve oxidação de periodato (ativação) para gerar grupamentos aldeído reativos sobre o polissacarídeo. O polissacarídeo ativado é então purificado por ultrafiltração para remover fragmentos de sacarídeo e subprodutos da reação de molécula pequena. O polissacarídeo ativado e CRM₁₉₇ são então combinados e co-

lioofilizados com sucrose como um crioprotetor. A etapa de conjugação é realizada em DMSO através de um mecanismo de aminação redutiva na presença de cianoboro-hidreto de sódio. Grupamentos aldeído não reagidos são reduzidos (rematados) pela adição de boro-hidreto de sódio. O conjugado é então purificado para remover CRM₁₉₇ não reagido e fragmentos de sacarídeo (por exemplo, por diafiltração versus tampão de fosfato seguido por salina tamponada), dando um concentrado da massa final do glicoconjugado em salina tamponada.

Embora uma proteína de veículo preferencial dentro do processo descrito acima seja a toxina diftérica mutada CRM₁₉₇, outras proteínas de veículo podem ser usadas para conjugação com o polissacarídeo sorotipo 19A dentro dos presentes métodos. As proteínas de veículo são escolhidas para aumentar a imunogenicidade do polissacarídeo sorotipo 19A ligado e/ou produzir anticorpos contra a proteína de veículo os quais são benéficos diagnosticamente, analítica e/ou terapeuticamente. Ligação covalente de uma molécula antigênica (por exemplo, um polissacarídeo) a um veículo confere reforço da imunogenicidade e dependência de células T (Pozsgay et al. (1999) *PNAS*, 96: 5194-97; Lee et al. (1976) *J. Immunol.*, 116: 1711-18; Dintzis et al. (1976) *PNAS*, 73: 3671-75). Conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, proteínas de veículo úteis incluem toxinas bacterianas inativadas tais como toxóide tetânico, toxóide pertussis, toxóide do cólera (por exemplo, conforme descrito no Requerimento de Patente Internacional Nº WO2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, e exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Proteínas da membrana externa bacteriana tais como complexo c da membrana externa, porinas, proteínas de ligação de transferrina, pneumolisina, proteína A da superfície pneumocócica, proteína adesina pneumocócica, C5a peptidase de streptococcus Grupo A ou Grupo B, ou proteína D de *Haemophilus influenzae*, também podem ser usadas. Outras proteínas, tais como ovalbumina, hemocianina de *keyhole limpet*, albumina sérica bovina, ou derivado de proteína purificada de tuberculina também podem ser usadas como proteínas de veículo.

Embora este processo de coliofilização e conjugação em DMSO

seja descrita para uso com o polissacarídeo sorotipo 19A, este processo também pode ser usado para sorotipos que sejam estruturalmente similares ao sorotipo 19A, tais como 6A, 6B, e 19F os quais também contêm ligações fosfodiéster entre suas unidades de repetição.

- 5 A descoberta acima descreve de modo geral a presente invenção. Um entendimento mais completo pode ser obtido por referência aos seguintes exemplos específicos. Estes exemplos são descritos somente para os fins de ilustração e não se pretende que limitem o âmbito da invenção.

EXEMPLOS

10 Exemplo 1

Preparação de Polissacarídeo Capsular de *S. Pneumoniae* Sorotipo 1

Preparação de Bancos de Célular Mestres e de Trabalho

- O sorotipo 1 de *S. pneumoniae* foi obtido da ATCC, American Type Culture Collection, cepa 6301. Várias gerações de estoques de sementes foram criadas de modo a expandir a cepa e remover componentes de origem animal (gerações F1, F2, e F3). Foram produzidas duas gerações adicionais de estoques de sementes. A primeira geração adicional foi preparada a partir de um frasco de F3, e a geração subsequente foi preparada a partir de um frasco da primeira geração adicional. Frascos de semente foram armazenados congelados ($<-70^{\circ}\text{C}$) com glicerol sintético como um criopreservante. Além de frascos congelados, frascos liofilizados foram preparados para a geração F4. Para a preparação do banco de células, todas as culturas foram cultivadas em um meio à base de soja. Antes de congelar, as células foram concentradas por centrifugação, meio gasto foi removido, e péletes celulares foram ressuspensos em meio fresco contendo um criopreservante, tal como glicerol sintético.

Fermentação e Coleta

- Culturas do banco de células de trabalho foram usadas para inocular frascos de semente contendo um meio à base de soja. Os frascos foram incubados a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sem agitação até terem sido satisfeitos os requisitos de crescimento. Um frasco de sementes foi usado para inocular um fermentador de semente contendo meio à base de soja. Um pH de cerca

de 7,0 foi mantido com solução estéril de carbonato de sódio. Depois de ter sido atingida a densidade ótica alvo, o fermentador de semente foi usado para inocular o fermentador da produção contendo meio à base de soja. O pH foi mantido com solução estéril de carbonato de sódio. A fermentação foi terminada depois de cessar o crescimento ou quando foi atingido o volume de trabalho do fermentador. Uma quantidade apropriada de sódio deoxicolato estéril a 12% foi adicionada à cultura para lisar as células bacterianas e liberar polissacarídeo associado a células. Depois de lisar, os conteúdos do fermentador foram resfriados. O pH do caldo de cultura lisado foi ajustado para aproximadamente pH 6,6 com ácido acético. O lisado foi clarificado por centrifugação de fluxo contínuo seguida por filtração de profundidade e microfiltração a 0,45 μm .

Em um processo alternativo, o pH da fermentação de cerca de 7,0 foi mantido com NaOH a 3 N. Depois de ter sido atingida a densidade ótica alvo, o fermentador de semente foi usado para inocular o fermentador da produção contendo meio à base de soja. O pH foi mantido com NaOH a 3 N. A fermentação foi terminada depois de cessar o crescimento ou quando foi atingido o volume de trabalho do fermentador. Uma quantidade apropriada de sódio deoxicolato estéril a 12% foi adicionada à cultura para obter uma concentração a 0,12% no caldo, para lisar as células bacterianas e liberar polissacarídeo associado às células. Depois da lisar, os conteúdos do fermentador foram mantidos, com agitação, por um intervalo de tempo entre 8 e 24 horas em uma temperatura entre 7°C e 13°C, para assegurar que tivesse ocorrido lise celular completa e liberação de polissacarídeo. Agitação durante este período de retenção evitou que o sedimento do lisado assentasse sobre as paredes do fermentador e sonda de pH, deste modo permitindo que fosse mantida a integridade da sonda de pH. Em seguida, o pH do caldo de cultura lisada foi ajustado para aproximadamente pH 5,0 com 50% de ácido acético. Depois de um tempo de retenção sem agitação, por um intervalo de tempo entre 12 e 24 horas em uma temperatura entre 15°C e 25°C, uma porção significativa das proteínas previamente solúveis desapareceu da solução como um precipitado sólido com pouca perda ou degradação do polis-

sacarídeo, o qual permaneceu em solução. A solução com o precipitado foi em seguida clarificada por centrifugação de fluxo contínuo seguida por filtração de profundidade e microfiltração a 0,45 µm.

Purificação

5 A purificação do polissacarídeo pneumocócico consistiu em várias operações de concentração / diafiltração, precipitação / elutriação, cromatografia de coluna, e etapas de filtração de profundidade. Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente a menos que especificado de modo diverso.

10 Caldo clarificado das culturas do fermentador de *S. pneumoniae* sorotipo 1 foi concentrado e diafiltrado usando um filtro de 100 kDa de MWCO (corte de peso molecular em quilodalton). Foi realizada diafiltração usando tampão de fosfato de sódio em pH neutro. Diafiltração removeu os componentes médios de baixo peso molecular dos biopolímeros de maior peso molecular tais como ácido nucleico, proteína e polissacarídeo.

15 O polissacarídeo foi precipitado da solução concentrada e diafiltrada adicionando brometo de hexadeciltrimetil amônio (HB) de uma solução de matéria-prima para dar uma concentração final de 1% de brometo de hexadeciltrimetil amônio (em peso / vol). O precipitado de polissacarídeo / brometo de hexadeciltrimetil amônio foi capturado sobre um filtro de profundidade e o filtrado foi descartado. O precipitado de polissacarídeo foi ressolubilizado e elutriado recirculando uma solução de cloreto de sódio através do filtro de profundidade contendo precipitado. Os filtros foram em seguida enxaguadas com solução adicional de cloreto de sódio.

25 Iodeto de sódio (NaI) foi adicionado à solução de polissacarídeo de uma solução de NaI de matéria-prima para atingir uma concentração final de 0,5% para precipitar brometo de hexadeciltrimetil amônio. O precipitado foi removido por filtração de profundidade. O filtrado contém o polissacarídeo alvo. O vaso de precipitação e o filtro foram enxaguados com uma solução de NaCl/NaI e o enxague foi combinado com a solução de polissacarídeo parcialmente purificada. O filtro foi descartado. O polissacarídeo foi então filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

A solução de polissacarídeo foi concentrada sobre um ultrafiltro de 30 kDa de MWCO e diafiltrada com uma solução de cloreto de sódio.

5 A solução de polissacarídeo parcialmente purificada foi adicionalmente purificada por filtração através de um filtro de profundidade impregnado com carbono ativado. Depois de filtração, o filtro de carbono foi enxaguado com uma solução de cloreto de sódio. O enxague é combinado com a solução de polissacarídeo, a qual é então filtrada através de um filtro de 0,2 μm .

10 A solução de polissacarídeo foi concentrada sobre um ultrafiltro de 30 kDa de MWCO e ajustada com um tampão de fosfato de sódio a 1 M para atingir uma concentração final de 0,025 M de fosfato de sódio. O pH foi checado e ajustado para $7,0 \pm 0,2$.

15 A coluna de hidroxiapatita cerâmica (HA) foi equilibrada com tampão de fosfato de sódio contendo cloreto de sódio para obter a condutividade apropriada ($<15 \mu\text{S}$). A solução de polissacarídeo foi em seguida carregada sobre a coluna. Sob estas condições, impurezas ligaram à resina e o polissacarídeo foi recuperado no fluxo direto da coluna. A solução de polissacarídeo foi filtrada através de filtros inline de 0,2 μm localizados antes e depois da coluna.

20 A solução de polissacarídeo foi concentrada usando um filtro de 30 kDa de MWCO. O concentrado foi em seguida diafiltrado com água para injeção (WFI, *Water for Injection*).

25 A solução de polissacarídeo diafiltrada foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 μm para dentro de frascos de polipropileno. Amostras foram removidas para experimentação da liberação e o polissacarídeo purificado foi armazenado congelado a $-25^\circ \pm 5^\circ\text{C}$.

Caracterização

30 Os dados de ^1H -RMN foram consistentes com a estrutura química pela atribuição de sinais atribuídos aos prótons da molécula de polissacarídeo. O espectro de ^1H -RMN apresentou uma série de sinais bem resolvidos (prótons do grupamento metila) para a quantificação do grupamento funcional O-acetil no polissacarídeo.

A identidade do polissacarídeo monovalente foi confirmada por imunoeletroforese contracorrente usando anti-soros específicos.

Cromatografia de filtração por gel de alta performance acoplada com detectores do índice refrativo e de dispersão da luz de laser multiângulo (MALLS) foi usada em combinação com a concentração da amostra para calcular o peso molecular.

Meio de cromatografia de exclusão de tamanho (CL-4B) foi usado para traçar o perfil da distribuição de peso molecular relativo do polissacarídeo.

Exemplo 2

10 Preparação de Conjugado de Sacarídeo Pneumocócico Sorotipo 1 – CRM₁₉₇ Ativação e Conjugação

Recipientes de polissacarídeo purificado foram degelados e combinados em um recipiente de reação. Ao recipiente, carbonato de sódio a 0,2 M, pH 9,0 foi adicionado para deacetilação parcial (hidrólise) por 3 ho-
15 ras a 50°C. A reação foi resfriada até 20°C e foi realizada neutralização por ácido acético a 0,2 M. Oxidação na presença de periodato de sódio foi realizada por incubação a 2 a 8°C, e a mistura foi agitada por 15 a 21 horas.

A mistura da reação de ativação foi concentrada e diafiltrada 10x com NaCl a 0,9% usando uma membrana de 30 K de MWCO. O retentado
20 foi filtrado a 0,2 µm. O sacarídeo ativado foi enchido em frascos de liofilização de vidro de 100 mL e congelado com revestimento a -75°C e liofilizado.

"Congelamento com revestimento" é um método para preparar a mostrax para liofilização (secagem por congelamento). Os frascos são automaticamente girados por rolos acionados a motor em um lote refrigerado
25 contendo álcool ou qualquer outro fluido apropriado. Uma camada delgada de produto é congelada uniformemente em torno do "revestimento" ("shell") interior de um frasco, permitindo que um maior volume de material seja processado com segurança durante cada rodada de secagem por congelamento. Estas unidades refrigeradas automáticas proporcionam um meio simples
30 e eficaz para pré-congelar muitos frascos de uma vez, produzindo os revestimentos desejados internos, e proporcionando área superficial suficiente para secagem por congelamento eficaz.

Frascos de material liofilizado foram trazidos até a temperatura ambiente e ressuspensos em solução de CRM₁₉₇ em uma proporção de sacarídeo / proteína de 2:1. À mistura de sacarídeo / proteína foi adicionado tampão de fosfato de sódio a 1 M para uma força iônica final de 0,2 M e um pH de 7,5, em seguida cianoboro-hidreto de sódio foi adicionado. A reação foi incubada a 23°C por 18 horas, seguida por uma segunda incubação a 37°C por 72 horas. Depois das incubações em cianoboro-hidreto, a mistura da reação foi diluída com salina fria seguida pela adição de carbonato de sódio a 1 M para ajustar a mistura da reação para pH 9,0. Aldeídos não reagidos foram extintos por adição de boro-hidreto de sódio por incubação a 23°C por 3 a 6 horas.

A mistura da reação foi diluída 2 vezes com salina e transferida através de um pré-filtro de 0,45 a 5 µm para dentro de um vaso de retentado. A mistura da reação é diafiltrada 30x com tampão de fosfato a 0,15 M, pH 6, e 20x com salina. O retentado foi filtrado através de um filtro a 0,2 µm.

A solução do conjugado foi diluída até um alvo de 0,5 mg/mL em salina a 0,9%, e em seguida filtrada estéril para dentro de recipientes de concentrado de massa final (FBC) em uma coifa Class 100. O conjugado foi armazenado a 2 a 8°C.

20 Caracterização

Meio de cromatografia de exclusão de tamanho (CL-4B) foi usado para traçar o perfil da distribuição de tamanho molecular relativo do conjugado.

A identidade do conjugado foi confirmada pela prova de *slot blot* usando antissoros específicos.

As concentrações de sacarídeos e de proteínas foram determinadas pelas provas de ácido urônico e de Lowry, respectivamente. A proporção de sacarídeo para proteína no complexo de conjugado ligado de modo covalente foi obtida pelo cálculo:

$$\text{Proporção} = \frac{\mu\text{g/mL de sacarídeo}}{\mu\text{g/mL de proteína}}$$

O teor de O-acetil foi medido pelo método de Hestrin (Hestrin et. al., J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249). A proporção da concentração de O-acetil para concentração de sacarídeo total deu μmols de O-acetil por mg de sacarídeo.

5 Exemplo 3

Preparação de Polissacarídeo Capsular de *S. Pneumoniae* Sorotipo 3

Preparação de Bancos de Células Mestres e de Trabalho

S. pneumoniae sorotipo 3 foi obtido do Dr. Robert Austrian, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania. Para preparação do sistema de banco de células, vide o Exemplo 1.

Fermentação e Coleta

Culturas do banco de células de trabalho foram usadas para inocular frascos de sementes contendo meio à base de soja. Os frascos foram incubados a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sem agitação até terem sido satisfeitos os requisitos de crescimento. Um frasco de sementes foi usado para inocular um fermentador de semente contendo meio à base de soja. Um pH de cerca de 7,0 foi mantido com solução estéril de carbonato de sódio. Depois de ter sido atingida a densidade ótica alvo, o fermentador de semente foi usado para inocular um fermentador intermediário de semente. Depois de ter sido atingida a densidade ótica alvo, o fermentador intermediário de semente foi usado para inocular o fermentador da produção. O pH foi mantido com solução estéril de carbonato de sódio. A fermentação foi terminada depois de ter sido atingido o volume de trabalho do fermentador. Uma quantidade apropriada de deoxicolato de sódio estéril a 12% foi adicionada à cultura para lisar as células bacterianas e liberar polissacarídeo associado com células. Depois de lisar, os conteúdos do fermentador foram resfriados. O pH do caldo de cultura lisado foi ajustado para aproximadamente pH 6,6 com ácido acético. O lisado foi clarificado por centrifugação de fluxo contínuo seguida por filtração de profundidade e microfiltração a $0,45\ \mu\text{m}$.

30 Purificação

A purificação do polissacarídeo pneumocócico consistiu de várias operações de concentração / diafiltração, precipitação / elutriação, cro-

matografia de coluna, e etapas de filtração de profundidade. Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente a menos que especificado de modo diverso.

Caldo clarificado das culturas do fermentador de *S. pneumoniae* sorotipo 3 foram concentrados e diafiltrados usando um filtro a 100 kDa de MWCO. Foi realizada diafiltração usando tampão de fosfato de sódio em pH neutro. Diafiltração removeu os componentes médios de baixo peso molecular dos biopolímeros de maior peso molecular tais como ácido nucleico, proteína e polissacarídeo.

Antes da adição de brometo de hexadeciltrimetil amônio (HB), um volume calculado de uma solução de matéria-prima de NaCl foi adicionado à solução de polissacarídeo concentrada e diafiltrada para dar uma concentração final de NaCl a 0,25 M. O polissacarídeo foi em seguida precipitado adicionando brometo de hexadeciltrimetil amônio a partir de uma solução de matéria-prima para dar uma concentração final de brometo de hexadeciltrimetil amônio a 1% (em peso/ vol). O precipitado de polissacarídeo / brometo de hexadeciltrimetil amônio foi capturado sobre um filtro de profundidade e o filtrado foi descartado. O precipitado de polissacarídeo foi ressolubilizado e elutriado recirculando uma solução de cloreto de sódio através do filtro de profundidade contendo precipitado. Os filtros foram em seguida enxaguados com solução de cloreto de sódio adicional.

Iodeto de sódio (NaI) foi adicionado à solução de polissacarídeo de uma solução de matéria-prima de NaI para atingir uma concentração final de 0,5% para precipitar brometo de hexadeciltrimetil amônio. O precipitado foi removido por filtração de profundidade. O filtrado continha o polissacarídeo alvo. O recipiente da precipitação e o filtro foram enxaguados com uma solução de NaCl/NaI e o enxague foi combinado com a solução de polissacarídeo parcialmente purificada. O filtro foi descartado. O polissacarídeo foi em seguida filtrado através de um filtro de 0,2 μm .

A solução de polissacarídeo foi concentrada sobre um ultrafiltro de 30 kDa de MWCO e diafiltrada com uma solução de cloreto de sódio.

A solução de polissacarídeo parcialmente purificada foi adicionada

nalmente purificada por filtração através de um filtro de profundidade impregnado com carbono ativado. Depois de filtração, o filtro de carbono foi enxaguados com uma solução de cloreto de sódio. O enxague foi combinado com a solução de polissacarídeo, a qual foi em seguida filtrada através de um filtro de 0,2 μm .

A solução de polissacarídeo foi concentrada sobre um ultrafiltro de 30 kDa de MWCO e ajustada com um tampão de fosfato de sódio a 1 M para atingir uma concentração final de 0,025 M de fosfato de sódio. O pH foi checado e ajustado para $7,0 \pm 0,2$.

A coluna de hidroxiapatita cerâmica (HA) foi equilibrada com tampão de fosfato de sódio contendo cloreto de sódio para obter a condutividade apropriada (15 μS). A solução de polissacarídeo foi em seguida carregada sobre a coluna. Sob estas condições, impurezas ligaram à resina e o polissacarídeo foi recuperado no fluxo direto da coluna. O polissacarídeo foi jateado através da coluna com tampão e foi filtrado através de um filtro de 0,2 μm .

A solução de polissacarídeo foi concentrada usando um filtro de 30 kDa de MWCO. O concentrado foi em seguida diafiltrado com WFI.

A solução de polissacarídeo diafiltrada foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 μm para dentro de recipientes de aço inoxidável. As amostras foram removidas para experimentação da liberação e o polissacarídeo purificado foi armazenado congelado a $-25^\circ \pm 5^\circ\text{C}$.

Caracterização

Os dados de ^1H -RMN foram consistentes com a estrutura química pela atribuição de sinais atribuídos aos prótons da molécula de polissacarídeo.

A identidade do polissacarídeo monovalente foi confirmada por imunoeletroforese contracorrente usando antissoros específicos.

Cromatografia de filtração por gel de alta performance, acoplada com detectores do índice refrativo e da dispersão da luz de laser multiângulo (MALLS), foi usada em combinação com a concentração da amostra para calcular o peso molecular.

Meios de cromatografia por exclusão de tamanho (CL-4B) foi

usado para traçar o perfil da distribuição de peso molecular relativa do polissacarídeo.

Exemplo 4

Preparação de Conjugado de Sacarídeo Pneumocócico Sorotipo 3 – CRM₁₉₇

5 Ativação e Conjugação

Recipientes de sacarídeo sorotipo 3 purificado foram degelados e combinados em um vaso de reação. Ao recipiente, WFI e ácido acético a 2 M foram adicionados para uma concentração final de 0,2 M e 2 mg/mL de sacarídeo. A temperatura da solução foi aumentada para 85°C por uma hora para hidrolisar o polissacarídeo. A reação foi resfriada até $\leq 25^{\circ}\text{C}$ e cloreto de magnésio a 1 M foi adicionado para uma concentração final de 0,1 M. Oxidação na presença de periodato de sódio foi realizada por incubação por 16 a 24 horas a 23°C.

A mistura da reação de ativação foi concentrada e diafiltrada 10x com WFI usando uma membrana de 100 K de MWCO. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 μm .

Para combinar, fosfato de sódio a 0,2 M, pH 7,0, foi adicionado ao sacarídeo ativado até uma concentração final de 10 mM e um pH de 6,0 a 6,5. Proteína de veículo CRM₁₉₇ foi misturada com a solução de sacarídeo para uma proporção de 2 g de sacarídeo por 1 g de CRM₁₉₇. A solução de sacarídeo / proteína combinados foi enchida em de vidro de 100 mL frascos de liofilização com um enchimento alvo de 50 mL, congelados com revestimento a -75°C , e liofilizados.

Frascos de material coliofilizado de sacarídeo / proteína foram trazidos até a temperatura ambiente e ressuspensos em tampão de fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,0, para uma concentração de sacarídeo final de 20 mg/mL. O pH foi ajustado para 6,5 e em seguida foi adicionado um equivalente 0,5 molar de cianoboro-hidreto de sódio. A reação foi incubada a 37°C por 48 horas. Depois da incubação com cianoboro-hidreto, a mistura da reação foi diluída com tampão frio a 5 mM de succinato / salina a 0,9%. Aldeídos não reagidos foram extintos pela adição de boro-hidreto de sódio e incubação a 23°C por 3 a 6 horas. A mistura da reação foi transferida através de

um pré-filtro de 0,45 a 5 µm para dentro de um vaso de retentado.

A mistura da reação foi diafiltrada 30x com tampão de fosfato a 0,1 M (pH 9), 20x com tampão de fosfato a 0,15 M (pH 6), e 20x com 5 mM de succinato / salina a 0,9%. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

A solução do conjugado foi diluída para um sacarídeo alvo de 0,5 mg/mL, e em seguida filtrada estéril para dentro de recipientes de concentrado de massa final em uma coifa Class 100. O conjugado foi armazenado em 2 a 8°C.

10 Caracterização

Meio de cromatografia de exclusão de tamanho (CL-4B) foi usado para traçar o perfil da distribuição de tamanho molecular relativo do conjugado.

A identidade do conjugado foi confirmada pela prova de *slot blot* usando antissoros específicos.

As concentrações de sacarídeos e de proteínas foram determinadas pelas provas de Anthrone e Lowry, respectivamente. A proporção de sacarídeo para proteína no complexo de conjugado ligado de modo covalente foi obtida pelo cálculo:

$$20 \quad \text{Proporção} = \frac{\mu\text{g/mL de sacarídeo}}{\mu\text{g/mL de proteína}}$$

Exemplo 5

Preparação de Polissacarídeo Capsular de *S. Pneumoniae* Sorotipo 5

25 *S. pneumoniae* sorotipo 5 foi obtido do Dr. Gerald Schiffman da State University de New York, Brooklyn, New York. Para preparação do sistema de banco de células, vide o Exemplo 1. Para fermentação, coleta, purificação e caracterização do polissacarídeo, vide o Exemplo 1.

Processo de Fermentação Alternativo

30 Culturas do banco de células de trabalho foram usadas para inocular frascos de sementes contendo um meio à base de soja e uma solução a estéril a 10 mM de NaHCO₃. Os frascos foram incubados a 36°C ± 2° C sem agitação até terem sido satisfeitos os requisitos de crescimento. Um

frasco de sementes foi usado para inocular um fermentador de semente contendo meio à base de soja e uma solução estéril a 10 mM de NaHCO_3 . Um pH de cerca de 7,0 foi mantido com NaOH a 3 N. Depois de ter sido atingida a densidade ótica alvo, o fermentador de semente foi usado para inocular o fermentador da produção contendo meio à base de soja com uma concentração de 10 mM de NaHCO_3 . O pH foi mantido com NaOH a 3 N. A fermentação foi terminada depois de cessar o crescimento ou quando tiver sido atingido o volume de trabalho do fermentador. Uma quantidade apropriada de sódio deoxicolato estéril a 12% foi adicionada à cultura para obter uma concentração de 0,12% no caldo, para lisar as células bacterianas e liberar polissacarídeo associado com células. Depois de lisar, os conteúdos do fermentador foram mantidos, com agitação, por um intervalo de tempo entre 8 e 24 horas em uma temperatura entre 7°C e 13°C para assegurar que tivessem ocorrido lise celular completa e liberação de polissacarídeo. Agitação durante este período de retenção evitou que o sedimento do lisado assentasse sobre as paredes do fermentador e sonda de pH, deste modo permitindo que fosse mantida a integridade da sonda de pH. Em seguida, o pH do caldo de cultura lisada foi ajustado para aproximadamente pH 4,5 com 50% de ácido acético. Depois de um tempo de retenção sem agitação, por um intervalo de tempo entre 12 e 24 horas em uma temperatura entre 15°C e 25°C, uma porção significativa das proteínas previamente solúveis desapareceu da solução como um precipitado sólido com pouca perda ou degradação do polissacarídeo, o qual permaneceu em solução. A solução com o precipitado foi em seguida clarificada por centrifugação de fluxo contínuo seguida por filtração de profundidade e microfiltração a 0,45 μm .

Exemplo 6

Preparação de Conjugado de Sacarídeo Pneumocócico Sorotipo 5– CRM₁₉₇

Ativação e Conjugação

Recipientes de sacarídeo sorotipo 5 foram degelados e combinados em um vaso de reação. Ao vaso, acetato de sódio a 0,1 M, pH 4,7, foi adicionado seguido por oxidação na presença de periodato de sódio por incubação por 16 a 22 horas a 23°C.

A mistura da reação de ativação foi concentrada e diafiltrada 10x com WFI usando uma membrana de 100 K de MWCO. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

O sacarídeo sorotipo 5 ativado foi combinado com CRM₁₉₇ em uma proporção de 0,8:1. A solução de sacarídeo / proteína combinados foi enchida dentro de frascos de liofilização de vidro de 100 mL (enchimento alvo de 50 mL), congelada com revestimento a -75°C, e coliofilizada.

Frascos de material liofilizado foram trazidos até a temperatura ambiente e ressuspensos em 0,1 M de fosfato de sódio, pH 7,5, e cianoboro-hidreto de sódio foi adicionado. A reação foi incubada a 30°C por 72 horas, seguida por uma segunda adição de cianoboro-hidreto e incubada a 30°C por 20 a 28 horas.

Depois das incubações de cianoboro-hidreto, a mistura da reação foi diluída 2 vezes com salina e transferida através de um pré-filtro de 0,45 a 5 µm para dentro de um vaso de retentado. A mistura da reação foi diafiltrada 30x com tampão de fosfato a 0,01 M, pH 8, 20x com tampão de fosfato a 0,15 M, pH 6, e 20x com salina. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

A solução do conjugado foi diluída para um sacarídeo alvo de 0,5 mg/mL, e em seguida filtrada estéril para dentro de recipientes de concentrado de massa final em uma coifa Class 100. O conjugado foi armazenado em 2 a 8°C.

Para a caracterização do conjugado, vide o Exemplo 2.

Exemplo 7

25 Preparação de Polissacarídeo Capsular de *S. Pneumoniae* Sorotipo 6A

S. pneumoniae sorotipo 6A foi obtido do Dr. Gerald Schiffman da State University of New York, Brooklyn, New York. Para preparação do sistema de banco de células, vide o Exemplo 1. Para fermentação, coleta e purificação do polissacarídeo, vide o Exemplo 1, exceto que durante purificação, é omitida a etapa de concentração a 30 kDa de MWCO, antes da etapa de cromatografia.

Exemplo 8

Preparação de Conjugado de Sacarídeo Pneumocócico Sorotipo 6A– CRM₁₉₇

Ativação e Conjugação

Polissacarídeo sorotipo 6A é um polímero de alto peso molecular que teve de ser reduzido de tamanho antes da oxidação. Recipientes de sacarídeo sorotipo 6A foram degelados e combinados em um vaso de reação. Ao vaso, ácido acético a 2 M foi adicionado para uma concentração final de 0,1 M para hidrólise por 1,5 horas a 60°C. A reação foi resfriada até 23°C e foi realizada neutralização ajustando a mistura da reação com NaOH a 1 M para pH 6. Oxidação na presença de periodato de sódio foi realizada por incubação a 23°C por 14 a 22 horas.

A mistura da reação de ativação foi concentrada e diafiltrada 10x com WFI usando uma membrana de 100 K de MWCO. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

Sorotipo 6A foi combinado com sucrose e enchido dentro de frascos de liofilização de vidro de 100 mL (enchimento alvo de 50 mL) e congelado com revestimento a -75°C e liofilizado.

Frascos de material liofilizado foram trazidos até a temperatura ambiente e ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma proporção de sacarídeo / proteína de 1:1. Depois da adição de cianoboro-hidreto de sódio, a mistura da reação foi incubada a 23°C por 18 horas. Depois da incubação com cianoboro-hidreto, a mistura da reação foi diluída com salina fria. Aldeídos não reagidos foram extintos por adição de boro-hidreto de sódio por incubação a 23°C por 3 a 20 horas.

A mistura da reação diluída foi transferida através de um pré-filtro de 5 µm para dentro de um vaso de retentado. A mistura da reação foi diafiltrada 10x com NaCl a 0,9% e 30x com NaCl tamponado com succinato. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

A solução do conjugado foi diluída para um sacarídeo alvo de 0,5 mg/mL, e em seguida filtrada estéril para dentro de recipientes de concentrado de massa final em uma coifa Class 100. O conjugado foi armazenado em 2 a 8°C.

Para a caracterização do conjugado, vide o Exemplo 2.

Exemplo 9

Preparação de Polissacarídeo Capsular de *S. Pneumoniae* Sorotipo 7F

S. pneumoniae sorotipo 7F foi obtido do Dr. Gerald Schiffman da State University of New York, Brooklyn, New York. Para preparação do sistema de banco de células, e para fermentação e coleta do polissacarídeo, vide o Exemplo 3. Para um processo de fermentação e coleta alternativo, vide o processo alternativo descrito no Exemplo 1.

Purificação

A purificação do polissacarídeo pneumocócico consistiu de várias operações de concentração / diafiltração, precipitação / elutriação, cromatografia de coluna, e etapas de filtração de profundidade. Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente a menos que especificado de modo diverso.

Caldo clarificado de culturas do fermentador de *S. pneumoniae* sorotipo 7F foram concentrados e diafiltrados usando um filtro de 100 kDa de MWCO. Foi realizada diafiltração usando tampão de fosfato de sódio em pH neutro. Diafiltração removeu os componentes médios de baixo peso molecular dos biopolímeros de maior peso molecular tais como ácido nucleico, proteína e polissacarídeo.

O sorotipo 7F não forma um precipitado com brometo de hexadeciltrimetil amônio. Ao invés, impurezas foram precipitadas da solução concentrada e diafiltrada adicionando o brometo de hexadeciltrimetil amônio a partir de uma solução de matéria-prima até uma concentração final de 1% de brometo de hexadeciltrimetil amônio. O precipitado foi capturado sobre um filtro de profundidade e o filtro foi descartado. O polissacarídeo foi contido no filtrado.

Iodeto de sódio (NaI) foi adicionado à solução de polissacarídeo a partir de uma solução de NaI de matéria-prima para atingir uma concentração final de 0,5% para precipitar brometo de hexadeciltrimetil amônio. O precipitado foi removido por filtração de profundidade. O filtrado continha o polissacarídeo alvo. O vaso de precipitação e o filtro foram enxaguados com

uma solução de NaCl/NaI e os enxagues foram combinados com a solução de polissacarídeo parcialmente purificado. O filtro foi descartado. O polissacarídeo foi em seguida filtrado através de um filtro de 0,2 μm .

5 A solução de polissacarídeo foi concentrada sobre um ultrafiltro de 30 kDa de MWCO e diafiltrada com uma solução de cloreto de sódio.

A solução de polissacarídeo parcialmente purificado foi adicionalmente purificada por filtração através de um filtro de profundidade impregnado com carbono ativado. Depois da filtração, o filtro de carbono foi enxaguado com uma solução de cloreto de sódio. O enxague foi combinado
10 com a solução de polissacarídeo, a qual foi então filtrada através de um filtro de 0,2 μm .

A solução de polissacarídeo foi concentrada em um ultrafiltro de 30 kDa de MWCO e ajustado com um tampão de fosfato de sódio a 1 M para obter uma concentração final de fosfato a sódio a 0,025 M. O pH foi checado
15 e ajustado para $7,0 \pm 0,2$.

A coluna de hidroxiapatita cerâmica (HA) foi equilibrada com tampão de fosfato de sódio contendo cloreto de sódio para obter a condutividade apropriada (15 μS). A solução de polissacarídeo foi em seguida carregada sobre a coluna. Sob estas condições, impurezas ligadas à resina e o
20 polissacarídeo foi recuperado no fluxo direto da coluna. O polissacarídeo foi jateado através da coluna com tampão e foi filtrado através de um filtro de 0,2 μm .

A solução de polissacarídeo foi concentrada usando um filtro de 30 kDa de MWCO. O concentrado foi em seguida diafiltrado com WFI.

25 A solução de polissacarídeo diafiltrada foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 μm para dentro de recipientes de aço inoxidável. Amostras foram removidas para prova de liberação e o polissacarídeo purificado foi armazenado em 2° a 8°C .

Para caracterização do polissacarídeo, vide o Exemplo 3.

Exemplo 10

Preparação de Conjugado de Sacarídeo Pneumocócico Sorotipo 7F– CRM₁₉₇

Ativação e Conjugação

5 Oxidação na presença de periodato de sódio foi realizada por incubação por 16 a 24 horas a 23°C.

A mistura da reação de ativação foi concentrada e diafiltrada 10x com NaOAc a 10 mM, pH 4,5, usando uma membrana de 100 K de MWCO. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

10 Sorotipo 7F foi enchido em frascos de liofilização de vidro de 100 mL (preenchimento alvo de 50 mL) e congelado com revestimento a -75°C e liofilizado.

15 Frascos de sorotipo liofilizado 7F e CRM₁₉₇ foram trazidos até a temperatura ambiente e ressuspensos em DMSO em uma proporção de sacarídeo / proteína de 1,5:1. Depois da adição de cianoboro-hidreto de sódio, a reação foi incubada a 23°C por 8 a 10 horas. Aldeídos não reagidos foram extintos pela adição de boro-hidreto de sódio por incubação a 23°C por 16 horas.

20 A mistura da reação foi diluída 10 vezes com salina fria e transferida através de um pré-filtro de 5 µm para dentro de um vaso de retentado. A mistura da reação foi diafiltrada 10x com salina a 0,9% e 30x com salina tamponada com succinato. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

25 A solução do conjugado foi diluída para um sacarídeo alvo de 0,5 mg/mL de salina a 0,9%, e em seguida filtrada estéril para dentro de recipientes de concentrado de massa final em uma coifa Class 100. O conjugado foi armazenado em 2 a 8°C.

Para caracterização do conjugado, vide o Exemplo 4.

Exemplo 11

Preparação de Polissacarídeo Capsular de *S. Pneumoniae* Sorotipo 19A

30 *S. pneumoniae* sorotipo 19A foi obtido do Dr. Gerald Schiffman da State University of New York, Brooklyn, New York. Para preparação do sistema de banco de células, vide o Exemplo 1. Para fermentação, coleta e purificação do polissacarídeo, vide o Exemplo 7. Para caracterização, vide o

Exemplo 3.

Exemplo 12

Preparação de Sacarídeo Pneumocócico Sorotipo 19A– CRM₁₉₇ Conjugado
Ativação e Conjugação

5 Recipientes de sacarídeo sorotipo 19A foram degelados e combinados em um recipiente de reação. Acetato de sódio foi adicionado a 10 mM (pH 5,0) e foi realizada oxidação na presença de periodato de sódio por incubação por 16 a 24 horas a 23°C.

10 A mistura da reação de ativação foi concentrada e diafiltrada 10x com 10 mM de acetato, pH 5,0, usando uma membrana de 100 K de MWCO. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

15 O sacarídeo ativado foi combinado com sucrose seguido pela adição de CRM₁₉₇. A mistura de sacarídeo ativado sorotipo 19A e CRM₁₉₇ (proporção a 0,8:1) foi enchida em frascos de liofilização de vidro de 100 mL (preenchimento alvo de 50 mL) e congelada com revestimento a -75°C e liofilizada.

20 Frascos de material liofilizado foram trazidos até a temperatura ambiente e ressuspensos em DMSO. À mistura de sacarídeo / proteína, foi adicionado cianoboro-hidreto de sódio (100 mg/ml). A reação foi incubada a 23°C por 15 horas. Depois da incubação de cianoboro-hidreto, aldeídos não reagidos foram extintos pela adição de boro-hidreto de sódio por incubação a 23°C por 3 a 20 horas.

25 A mistura da reação foi diluída 10 vezes com salina a frio e transferida através de um pré-filtro de 5 µm para dentro de um vaso de retentado. A mistura da reação foi diafiltrada 10x com 0,9% de NaCl, filtrada por 0,45 µm, e 30x com diafiltração usando 5 mM de succinato / 0,9% de tampão de NaCl, pH 6. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm.

30 A solução do conjugado foi diluída para um alvo de 0,5 mg/mL usando 5 mM de succinato / salina a 0,9%, e em seguida filtrada estéril para dentro de recipientes de concentrado de massa final em uma coifa Class 100. O conjugado foi armazenado a 2 - 8°C.

Para caracterização do conjugado, vide o Exemplo 4.

Exemplo 13

Preparação de Polissacarídeo Capsular de *S. Pneumoniae*

Sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F

Preparação da Cultura de Semente de *S. pneumoniae*

5 *S. pneumoniae* sorotipos 4, 6B, 9V, 18C, 19F e 23F foram obtidos do Dr. Gerald Schiffman, State University of New York, Brooklyn, New York. *S. pneumoniae* sorotipo 14 foi obtido da ATCC, cepa 6314.

 Separadamente, um frasco de cada um dos sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* desejados foi usado para iniciar um lote de fermentação. Dois frascos contendo um meio à base de soja e vermelho fenol foram
10 ajustados a uma faixa de pH de $7,4 \pm 0,2$ usando carbonato de sódio, e o volume requerido de solução a 50% de dextrose / 1% de sulfato de magnésio foi em seguida adicionado aos frascos. Os dois frascos foram inoculados com diferentes quantidades de semente. Os frascos foram incubados a $36^\circ \pm$
15 2°C até o meio ficar amarelo. Depois da incubação, as amostras foram removidas de cada frasco e testadas para densidade ótica (OD) (0,3 a 0,9) e pH (4,6 a 5,5). Um dos dois frascos foi selecionado para inoculação do fermentador de semente.

 Meio à base de soja foi transferido para o fermentador de semente e esterilizado. Em seguida um volume de solução de 50% de dextrose / 1% de sulfato de magnésio foi adicionado ao fermentador. O pH e a agitação do fermentador de semente foram monitorados e controlados (pH 6,7 a 7,4). A temperatura foi mantida a $36^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. O inóculo de sementes (frasco) foi asseticamente conectado ao fermentador de semente e o inóculo foi
20 transferido. O fermentador foi mantido em controle de pH e as amostras foram periodicamente removidas e testadas para OD e pH. Quando a OD desejada de 0,5 a 600 nm foi atingida, o fermentador intermediário foi inoculado com o caldo de fermentação do fermentador de semente.

 Meio à base de soja foi transferido para o fermentador intermediário e esterilizado. Em seguida um volume de solução a 50% de dextrose / 1% de sulfato de magnésio foi adicionado ao fermentador. O pH e a agitação do fermentador intermediário foram monitorados e controlados (pH 6,7 a
30

7,4). A temperatura foi mantida a $36^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O conteúdo do fermentador de semente foi transferido para o fermentador intermediário. O fermentador foi mantido em pH controle e as amostras foram periodicamente removidas e testadas para OD e pH. Quando a OD desejada de 0,5 a 600 nm foi atingida, o fermentador da produção foi inoculado com o caldo de fermentação do fermentador intermediário.

Meio à base de soja foi transferido para o fermentador da produção e esterilizado. Em seguida um volume de solução a 50% de dextrose / 1% de sulfato de magnésio foi adicionado ao fermentador. O pH e a agitação do fermentador da produção foram monitorados e controlados (pH 6,7 a 7,4). A temperatura foi mantida a $36^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O fermentador foi mantido em pH controle e as amostras foram periodicamente removidas e testadas para OD e pH, até a fermentação estar completa.

Sódio deoxicolato foi adicionado ao fermentador até uma concentração final de cerca de 0,12% em peso/ vol. A cultura foi misturada por um mínimo de trinta minutos e o ponto de ajuste da temperatura foi reduzido para 10°C . A cultura foi incubada de um dia para o outro e depois de confirmação da inativação, o pH da cultura foi ajustado para entre 6,4 e 6,8, conforme necessário, com 50% de ácido acético. A temperatura do fermentador foi aumentada para $20^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ e os conteúdos foram transferidos para o tanque de retenção de clarificação.

Os conteúdos do tanque de retenção de clarificação (incluindo os debrís celulares) foram processados através de uma centrifuga em uma taxa de fluxo entre 25 e 600 litros por hora (exceto o Sorotipo 4, em que os debrís celulares foram descartados e a taxa de fluxo foi comprimida até entre 25 e 250 litros por hora). Amostras do sobrenadante foram removidas e testadas para OD. A OD desejada durante a centrifugação foi $\leq 0,15$.

Inicialmente, o sobrenadante foi recirculado através de uma montagem de filtro de profundidade até ser obtida uma OD de $0,05 \pm 0,03$. Em seguida o sobrenadante foi passado através da montagem de filtro de profundidade e através de um filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ para o tanque de retenção do filtrado.

Subsequentemente, o produto foi transferido através de tubos fechados para a área de purificação para processamento.

Todas as operações acima (centrifugação, filtração e transferência) foram realizadas entre 10°C a 30°C.

- 5 Para um processo de fermentação e coleta alternativo para os sorotipos 4 e 6B, vide o processo alternativo descrito no Exemplo 1.

Purificação

- 10 A purificação de cada polissacarídeo pneumocócico consistiu de várias operações de concentração / diafiltração, precipitação / elutriação, cromatografia de coluna, e etapas de filtração de profundidade. Todos os procedimentos foram realizadas em temperatura ambiente a menos que especificado de modo diverso.

- 15 Caldo clarificado das culturas do fermentador do sorotipo de *S. pneumoniae* desejado foi concentrado e diafiltrado usando um filtro de 100 kDa de MWCO. Diafiltração foi realizada usando tampão de fosfato de sódio a pH < 9,0. Diafiltração removeu os componentes médios de baixo peso molecular dos biopolímeros de maior peso molecular tais como ácido nucleico, proteína e polissacarídeo.

- 20 O polissacarídeo foi precipitado da solução concentrada e diafiltrada adicionando brometo de hexadeciltrimetil amônio de uma solução de matéria-prima para dar uma concentração final de 1% de brometo de hexadeciltrimetil amônio (em peso/ vol) (exceto o Sorotipo 23F, o qual tinha uma concentração final de 2,5%). O precipitado de polissacarídeo / brometo de hexadeciltrimetil amônio foi capturado sobre um filtro de profundidade e o filtrado foi descartado. (Nota: O sorotipo 14 não precipita; portanto o filtrado foi retido.) O precipitado de polissacarídeo foi ressolubilizado e elutriado recirculando uma solução de cloreto de sódio através do filtro de profundidade contendo precipitado. Os filtros foram em seguida enxaguados com solução adicional de cloreto de sódio.

- 30 Iodeto de sódio (NaI) foi adicionado à solução de polissacarídeo de uma solução de NaI de matéria-prima para atingir uma concentração final de 0,5% para precipitar brometo de hexadeciltrimetil amônio (exceto pelo

Sorotipo 6B, o qual tinha uma concentração final de 0,25%). O precipitado foi removido por filtração de profundidade. O filtrado continha o polissacarídeo alvo. O filtro foi descartado. O polissacarídeo foi em seguida filtrado através de um filtro de 0,2 μm .

5 A solução de polissacarídeo foi concentrada sobre um ultrafiltro de 30 kDa de MWCO e diafiltrada com uma solução de cloreto de sódio.

A solução de polissacarídeo parcialmente purificada foi adicionalmente purificada por filtração através de um filtro de profundidade impregnado com carbono ativado. Depois da filtração, o filtro de carbono foi enxaguado com uma solução de cloreto de sódio. O enxague foi combinado com
10 a solução de polissacarídeo, a qual foi em seguida filtrada através de um filtro de 0,2 μm .

A solução de polissacarídeo foi concentrada sobre um ultrafiltro de 30 kDa de MWCO e o filtro foi enxaguado com uma solução de cloreto de sódio. O pH foi checado e ajustado para $7,0 \pm 0,3$.
15

A coluna de hidroxiapatita cerâmica (HA) foi equilibrada com tampão de fosfato de sódio contendo cloreto de sódio até o pH ser $7,0 \pm 0,3$ e a condutividade foi de $26 \pm 4 \mu\text{S}$. A solução de polissacarídeo foi em seguida carregada sobre a coluna. Sob estas condições, impurezas ligaram à resina e o polissacarídeo foi recuperado no fluxo através da coluna. A solução de polissacarídeo foi filtrada através de um filtro de 0,2 μm .
20

A solução de polissacarídeo foi concentrada usando um filtro de 30 kDa de MWCO. O concentrado foi em seguida diafiltrado com WFI até a condutividade ser $< 15 \mu\text{S}$.

25 A solução de polissacarídeo diafiltrada foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 μm para dentro de recipientes em massa e armazenada em 2 a 8°C.

Exemplo 14

Preparação dos Conjugados de Sacarídeos Pneumocócicos – CRM₁₉₇

30 Para os Sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F

Processo de Ativação

Os sacarídeos de sorotipos diferentes seguem diferentes cami-

nhos para ativação (hidrólise ou sem hidrólise antes da ativação) e conjugação (reações aquosas ou de DMSO) conforme descrito neste exemplo.

Polissacarídeo foi transferido dos recipientes em massa para o vaso do reator. O polissacarídeo foi em seguida diluído em WFI e fosfato de sódio para uma faixa de concentração final de 1,6 a 2,4 mg/mL.

Etapa 1.

Para os sorotipos 6B, 9V, 14, 19F e 23F, pH foi ajustado para pH $6,0 \pm 0,3$.

Para o sorotipo 4, ácido clorídrico (concentração final de ácido de 0,01 M) foi adicionado e a solução foi incubada por 25 a 35 minutos a $45^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Hidrólise foi interrompida resfriando até 21 a 25°C e adicionando fosfato de sódio a 1 M para um alvo de pH $6,7 \pm 0,2$. Um teste *in-process* foi feito para confirmar um nível apropriado de despiruvilação.

Para o sorotipo 18C, ácido acético glacial (concentração de ácido final de 0,2 M) foi adicionado e a solução foi incubada por 205 a 215 minutos a $94^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. A temperatura foi em seguida reduzida para 21 a 25°C e fosfato de sódio a 1 a 2 M foi adicionado a um alvo de pH $6,8 \pm 0,2$.

Etapa 2: Reação de Periodato

Os equivalentes molares de periodato de sódio requeridos para ativação de sacarídeo pneumocócico foi determinado usando teor total de sacarídeo (exceto pelo sorotipo 4). Para o sorotipo 4, foi usada uma proporção de 0,8 a 1,2 mols de periodato de sódio por mol de sacarídeo. Com completa mistura, a reação de oxidação foi deixada para prosseguir entre 16 a 20 horas em 21 a 25°C para todos os sorotipos exceto 19F para o qual a temperatura foi $\leq 15^\circ\text{C}$.

Etapa 3: Ultrafiltração

O sacarídeo oxidado foi concentrado e diafiltrado com WFI (tampão de fosfato de sódio a 0,01 M pH 6,0 para o sorotipo 19F) sobre um ultrafiltro de 100 kDa de MWCO (ultrafiltro de 5 kDa por 18C). O permeado foi descartado e o retentado foi filtrado através de um filtro de 0,22 μm .

Etapa 4: Liofilização

Para os sorotipos 4, 9V, e 14 o sacarídeo concentrado foi mistu-

rado com proteína de veículo CRM₁₉₇, enchido dentro de frascos de vidro, congelado com revestimento e armazenado a $\leq -65^{\circ}\text{C}$. O concentrado de sacarídeo-CRM₁₉₇ congelado foi liofilizado e em seguida armazenado a $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

5 Para os sorotipos 6B, 19F, e 23F uma quantidade especificada de sucrose foi adicionada a qual foi calculada para obter uma concentração de sucrose de $5\% \pm 3\%$ na mistura da reação de conjugação. O sorotipo 18C não necessitou de adição de sucrose. O sacarídeo concentrado foi em
10 armazenado a $\leq -65^{\circ}\text{C}$. O sacarídeo concentrado congelado foi liofilizado e em seguida armazenado a $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Processo de Conjugação

Foram usados dois processos de conjugação: conjugação aquosa para os sorotipos 4, 9V, 14 e 18C, e conjugação de DMSO para os sorotipos 6B, 19F e 23F.
15

Conjugação Aquosa

Etapa 1: Dissolução

Para os sorotipos 4, 9V e 14, a mistura de sacarídeo ativado liofilizado -CRM₁₉₇ foi degelada e equilibrada em temperatura ambiente. O sacarídeo ativado liofilizado -CRM₁₉₇ foi em seguida reconstituído em tampão de fosfato de sódio a 0,1 M em uma proporção típica de:
20

- 1 L de tampão por 16 a 24 g de sacarídeo para o sorotipo 4 e 9V
- 1 L de tampão por 6 a 10 g de sacarídeo para o sorotipo 14

A mistura da reação foi incubada a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até dissolução total para o sorotipo 9V e a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para os sorotipos 4 e 14.
25

Para o sorotipo 18C, o sacarídeo liofilizado foi reconstituído em uma solução de CRM₁₉₇ em fosfato de sódio dibásico a 1 M em uma proporção típica de 0,11 L de fosfato de sódio por 1 L de solução de CRM₁₉₇. A mistura da reação (8 a 12 g/L de concentração de sacarídeo) foi incubada a
30 $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até dissolução total.

O pH foi testado como um controle *in-process* neste estágio.

Etapa 2: Reação de Conjugação

Para os sorotipos 4 e 9V, a reação de conjugação foi iniciada adicionando a solução de cianoboro-hidreto de sódio (100 mg/mL) para obter 1,0 a 1,4 mols de cianoboro-hidreto de sódio por mol de sacarídeo. A mistura da reação foi incubada por 44 a 52 horas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A temperatura foi em seguida reduzida para $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e cloreto de sódio a 0,9% foi adicionado ao reator. Solução de boro-hidreto de sódio (100 mg/mL) foi adicionado para obter 1,8 a 2,2 equivalentes molares de boro-hidreto de sódio por mol de sacarídeo. A mistura foi incubada por 3 a 6 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A mistura foi diluída com cloreto de sódio a 0,9% e o reator foi enxaguado. A mistura da conjugação diluída foi filtrada usando um pré-filtro de 1,2 μm para dentro de um vaso de retenção.

Para os sorotipos 14 e 18C, a reação de conjugação foi iniciada adicionando a solução de cianoboro-hidreto (100 mg/mL) para obter 1,0 a 1,4 mols de cianoboro-hidreto de sódio por mol de sacarídeo. A mistura da reação foi incubada por 12 a 24 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A temperatura foi aumentada para $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a reação foi incubada por 72 a 96 horas. A temperatura foi em seguida reduzida para $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 0,9% de cloreto de sódio foi adicionado ao reator. Solução de boro-hidreto de sódio (100 mg/mL) foi adicionada para obter 1,8 a 2,2 equivalentes molares de boro-hidreto de sódio por mol de sacarídeo. A mistura foi incubada por 3 a 6 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A mistura foi diluída com 0,9% de cloreto de sódio e o reator foi enxaguado. A mistura de conjugação diluída foi em seguida filtrada usando um pré-filtro de 1,2 μm para dentro de um vaso de retenção.

Etapa 3: 100 kDa de Ultrafiltração

A mistura de conjugação diluída foi concentrada e diafiltrada sobre um ultrafiltro de 100 kDa de MWCO com ou um mínimo de 15 volumes (sorotipo 4) ou 40 volumes (sorotipos 9V, 14, e 18C) de cloreto de sódio a 0,9%.

O permeado foi descartado.

Para o sorotipo 4, o retentado foi filtrado através de um filtro de 0,45 μm .

Um controle *in-process* (teor de sacarídeo) foi realizado nesta

etapa.

Etapa 4: Purificação de Coluna de HA

Esta etapa foi realizada somente para o conjugado do sorotipo 4.

A coluna de HA foi primeiro neutralizada usando tampão de fosfato de sódio a 0,5 M (pH $7,0 \pm 0,3$) e em seguida equilibrada com cloreto de sódio a 0,9%. O retentado filtrado (sorotipo 4) foi carregado sobre a coluna em uma taxa de fluxo de 1,0 L/min. A coluna foi lavada com cloreto de sódio a 0,9% em uma taxa de fluxo de $\leq 2,0$ L/min. O produto foi em seguida elutriado com tampão de fosfato de sódio a 0,5 M em uma taxa de fluxo de $\leq$ 2,0 L/min.

A fração de HA foi em seguida concentrada e diafiltrada sobre uma membrana de 100 kDa de MWCO com um mínimo de 20 volumes de cloreto de sódio a 0,9%. O permeado foi descartado.

Etapa 5: Filtração Estéril

O retentado depois da diafiltração a 100 kDa de MWCO foi filtrado através de um filtro de 0,22 μm . Controles *in-process* (teor de sacarídeo, proteína livre, sacarídeo livre e cianeto) foram realizados sobre o produto filtrado. Controles *in-process* sobre o retentado do filtrado foram realizados para determinar se foram necessárias concentração, diafiltração, e/ou diluição adicionais para satisfazer os alvos de concentrado de massa final. Estes testes e testes adicionais foram repetidos em amostras de concentrado de massa final.

Conforme necessário, o conjugado filtrado foi diluído com cloreto de sódio a 0,9% de modo a obter uma concentração final de menos de 0,55 g/L. Testes de liberação para teor de sacarídeo, teor de proteína e proporção de sacarídeo : proteína foram realizados neste estágio.

Finalmente, o conjugado foi filtrado (0,22 μm) e enchido dentro de latas de aço inoxidável de 10 L em uma quantidade típica de 2,64 g/ lata. Neste estágio, a produção, teor de sacarídeo, teor de proteína, pH, proporção de sacarídeo : proteína e teor de lisina foram realizadas como controles *in-process*. Provas de liberação (aspecto, proteína livre, sacarídeo livre, endotoxina, determinação do peso molecular, cianeto residual, identidade de

sacarídeo, identidade de CRM₁₉₇) foram realizadas neste estágio.

Conjugação de DMSO

Etapa I: Dissolução

Os sorotipos de sacarídeos ativados liofilizados 6B, 19F, 23F e a proteína de veículo CRM₁₉₇ liofilizada foram equilibrados em temperatura ambiente e reconstituídos em DMSO. A concentração de dissolução tipicamente variou de 2 a 3 gramas de sacarídeo (2 a 2,5 g de proteína) por litro de DMSO.

Etapa II: Reação de Conjugação

O sacarídeo ativado e proteína de veículo CRM₁₉₇ foram misturados por 60 a 75 minutos a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em uma faixa de proporção de 0,6 g a 1,0 g de sacarídeo/g CRM₁₉₇ para os sorotipos 6B e 19F ou 1,2 a 1,8 g de sacarídeo/g de CRM₁₉₇ para o sorotipo 23F.

A reação de conjugação foi iniciada adicionando a solução de cianoboro-hidreto de sódio (100 mg/mL) em uma proporção de 0,8 a 1,2 equivalentes molares de cianoboro-hidreto de sódio para um mol de sacarídeo ativado. WFI foi adicionado à mistura da reação para um alvo de 1% (v/v) e a mistura foi incubada por mais de 40 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Solução de boro-hidreto de sódio, 100 mg/mL (típico 1,8 a 2,2 equivalentes molares de boro-hidreto de sódio por mol de sacarídeo ativado) e WFI (alvo 5% em v/v) foram adicionados à reação e a mistura foi incubada por 3 a 6 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Este procedimento reduziu quaisquer aldeídos não reagidos presentes sobre os sacarídeos. Em seguida a mistura da reação foi transferida para um tanque de diluição contendo cloreto de sódio a 0,9% a $< 15^{\circ}\text{C}$.

Etapa III: Ultrafiltração de 100 kDa

A mistura de conjugado diluído foi filtrada através de um filtro de 1,2 μm e concentrada e diafiltrada sobre uma membrana de 100 kDa de MWCO com um mínimo de 15 volumes de cloreto de sódio a 0,9% (tampão de 0,01 M de fosfato de sódio / 0,05 M de NaCl foi usado para o sorotipo 23F). O permeado foi descartado. O retentado foi filtrado através de um filtro de 0,45 μm . Uma amostra do conteúdo de sacarídeo *in-process* foi colhida

neste estágio.

Etapa IV: Purificação de Coluna de DEAE

Esta etapa foi realizada somente para o sorotipo 23F.

A coluna de DEAE foi equilibrada com tampão de 0,01 M de fosfato de sódio / 0,05 M de cloreto de sódio. O retentado filtrado (sorotipo 23F) foi carregado sobre a coluna e lavado com tampão de 0,01 M de fosfato de sódio / 0,05 M de cloreto de sódio. A coluna foi em seguida lavada com tampão de 0,01 M de fosfato de sódio / 0,9% de NaCl. O produto foi em seguida elutriado com tampão de 0,01 M de fosfato de sódio / 0,5 M de cloreto de sódio.

Etapa V: Ultrafiltração a 100 kDa

O retentado de 6B e 19F foi concentrado e diafiltrado com no mínimo 30 volumes de cloreto de sódio a 0,9%. O permeado foi descartado.

O elutriado do sorotipo 23F foi concentrado e diafiltrado com um mínimo de 20 volumes de cloreto de sódio a 0,9%. O permeado foi descartado.

Etapa VI: Filtração Estéril

O retentado depois da diafiltração a 100 kDa de MWCO foi filtrado através de filtro de 0,22 µm. Controles *in-process* (teor de sacarídeo, proteína livre, sacarídeo livre, DMSO residual e cianeto residual) foram realizados sobre o produto filtrado. Controles *in-process* sobre retentado filtrado foram realizados para determinar se foram necessárias concentração, diafiltração, e/ou diluição adicionais para satisfazer os alvos de concentrado de massa final. Estes testes e testes adicionais foram repetidos em amostras de concentrado de massa final.

Conforme necessário, o conjugado filtrado foi diluído com cloreto de sódio a 0,9% para obter uma concentração final de menos de 0,55 g/L. Testes de liberação para teor de sacarídeo, teor de proteína e proporção de sacarídeo : proteína foram realizados neste estágio.

Finalmente, o conjugado foi filtrado (0,22 µm) e enchidos em latas de aço inoxidável de 10 L em uma quantidade de 2,64 g/ lata. Neste estágio, foram realizados produção, teor de sacarídeo, teor de proteína, pH,

proporção de sacarídeo : proteína e teor de lisina como controles *in-process*. Prova de liberação (aspecto, proteína livre, sacarídeo livre, endotoxina, determinação do peso molecular, cianeto residual, DMSO residual, identidade do sacarídeo e identidade da CRM₁₉₇) foi realizada neste estágio.

5 Exemplo 15

Formulação de uma Vacina de Conjugado Pneumocócico Multivalente

Os concentrados de massa final dos 13 conjugados contêm 0,85% de cloreto de sódio. concentrados de massa tipo 3, 6A, 7F e 19A também contêm 5 mM de tampão de succinato de sódio a pH 5,8. Os volumes requeridos de concentrados de massa foram calculados com base no volume do lote e nas concentrações de sacarídeo em massa. Depois de 80% do cloreto de sódio a 0,85% (fsalina fisiológica) e da quantidade requerida de tampão de succinato serem adicionados ao vaso de formulação pré-etiquetado, concentrados em massa foram adicionados. A preparação foi em seguida filtrada estéril através de uma membrana de 0,22 µm para dentro de um segundo recipiente usando uma unidade de filtro de membrana Millipore Durapore. O primeiro recipiente foi lavado com os restantes 20% de cloreto de sódio a 0,85% e a solução foi passada através do mesmo filtro e coletada dentro do segundo recipiente. A massa formulada foi misturada gentilmente durante e depois da adição de fosfato de alumínio em massa. O pH foi checado e ajustado caso necessário. O produto em massa formulado foi armazenado em 2 a 8°C.

O produto de massa formulado foi enchido em seringas de vidro de borossilicato Tipo 1 obtidas da Becton Dickinson. A vacina foi monitorada em intervalos regulares para turbidez para assegurar a uniformidade da operação de enchimento. A vacina enchida (Produto Final) foi armazenada em 2 a 8°C.

Exemplo 16

Imunogenicidade da Vacina de Conjugado 13-Valente

Até o momento, os estudos pré-clínicos realizados sobre a vacina 13vPnC têm sido em coelhos. Os estudos nº HT01-0021 e nº HT01-0036 foram desenhados para examinar de modo independente o efeito da conju-

gação química de polissacarídeos capsulares (PSs) de *S. pneumoniae* a CRM₁₉₇ e o efeito de adjuvante de fosfato de alumínio (AlPO₄) sobre a reação imune à vacina 13vPnC em coelhos. Estes efeitos foram caracterizados por ELISA antígeno-específico para concentrações séricas de IgG e para
 5 função de anticorpos por prova opsonofagocítica (OPA).

Estudo n^o HT01-0021

O estudo n^o HT01-0021 examinou a capacidade da vacina 13vPnC com adjuvante AlPO₄ para provocar reações imunes específicas para os sorotipos da vacina. Os sorotipos pneumocócicos representados na
 10 vacina 13vPnC incluem os tipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F. Objetivos secundários incluíram uma avaliação da cinética e da duração da reação de anticorpos. Coelhos New Zealand White foram imunizados por via intramuscular na semana 0 e na semana 2 com a dose clínica humana planejada de cada polissacarídeo (2 µg de cada PS, exceto 4 µg de
 15 6B) formulada com ou sem AlPO₄ (100 µg /dose). Soros foram coletado em vários pontos de tempo. IgG sorotipo específica foi medida por ELISA e a atividade funcional foi avaliada por OPA.

A Tabela 3 mostra o título médio geométrico (GMT) obtido em amostras de soro reunidas, depois de duas doses da vacina de 13vPnC.
 20 Uma proporção das IgG GMTs foi usada para comparar respostas da semana 4 à semana 0. Estes dados demonstram que a inclusão de AlPO₄ na formulação 13vPnC provocou maiores níveis de anticorpo IgG em comparação com a mesma vacina sem adjuvante. Embora as reações de anticorpos tenham sido maiores quando AlPO₄ foi incluído na formulação, estes aumentos
 25 não foram estatisticamente significativos.

Reações de anticorpos funcionais também foram avaliadas em coelhos depois de imunização com as duas formulações de 13vPnC (Tabela 4). Ao comparar formulações de vacina com ou sem adjuvante, foram observadas maiores GMTs em OPA no grupo de tratamento das vacinas 13vPnC
 30 + AlPO₄. Títulos OPA foram detectados em grupos de soro da semana 4 para todos os sorotipos da vacina em ambos os grupos. Para a maioria dos sorotipos, os títulos OPA medidos na semana 4 foram no mínimo 4 vezes mai-

ores do que os títulos na semana 0 (linha basal).

As reações cinéticas para cada um dos sorotipos de vacina 13vPnC foram avaliadas from serum pools de ambos os grupos de tratamento. Títulos de IgG para cada sorotipo foram medidos de coletas de sangue na semana 0 e semanas 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26, e 39 e em seguida comparados. Com a exceção do sorotipo 1, reações de anticorpos em animais recebendo vacina com adjuvante foram superiores às que receberam vacina sem adjuvante e tiveram pico na semana 2 do esquema de imunização (dados não mostrados).

Globalmente, os dados indicam que a vacina 13vPnC formulada com fosfato de alumínio é imunogênica em coelhos, provocando reações de anticorpos substanciais para os polissacarídeos capsulares pneumocócicos contidos na vacina e estas reações estão associadas com atividade funcional. As reações observadas para os sete sorotipos de núcleo depois de imunização com 13vPnC + AlPO_4 são consistentes com reações históricas de coelhos para a formulação heptavalente.

Tabela 3. Reações Imunes de IgG de Coelho (GMTs) Depois de Imunização com Duas Doses de Glicoconjugado Pneumocócico 13-valente

Sorotipo	Diluyente com ALPO ₄ ^a				13vPnC ^a		13vPnC + ALPO ₄ ^a	
	Semana 0		Semana 4		Proporção Semana 4 : Semana 0	Semana 4 (95% CI)	Proporção Semana 4 : Semana 0	Semana 4 (95% CI)
	Semana 0	Semana 4	Semana 0	Semana 4				
1	<100	<100	1,0	50	119	5,926 (2.758-12.733)	50	11,091 (5.327-23.093)
3	<100	<100	1,0	50	133	6,647 (2.773-15.932)	58	16,443 (7.096-38.106)
4	<100	<100	1,0	50	271	13,554 (8.031-22.875)	50	29,183 (15.342-55.508)
5	134	<100	0,4	50	117	5,859 (2.450-14.009)	50	16,714 (6.959-40.140)
6A	141	<100	0,4	74	303	22,415 (11.987-41.914)	83	63,734 (21.141-192.146)
6B	<100	<100	1,0	57	142	8,108 (3.564-18.444)	54	23,505 (11.286-48.955)
7F	3.859	579	0,2	171	444	43,591 (26.931-70.557)	143	84,888 (46.445-155.151)

Tabela 3. –continuação-

Sorotipo	Diluinte com ALPO ₄ ^a				13vPnC ^a		13vPnC + ALPO ₄ ^a	
	Semana 0	Semana 4	Proporção		Semana 4 (95% CI)	Proporção Semana 4 : Semana 0	Semana 0	Proporção Semana 4 : Semana 0
			Semana 4	Semana 0				
9V	289	995	3,4	205	15.780 (7.193-34.616)	125	208	43.331 ^b (23.256-71.510)
14	437	177	0,4	61	6.906 (3.416-13.962)	113	70	16.076 (9.649-26.785)
18C	<100	<100	1,0	50	21.283 (15.770-28.725)	426	50	35.040 (24.708-49.692)
19A	<100	<100	1,0	121	113.599 (54.518-236.707)	939	144	280.976 (119.587-660.167)
19F	<100	<100	1,0	50	14.365 (7.346-28.090)	287	50	24.912 (9.243-67.141)
23F	<100	<100	1,0	50	5.323 (1.894-14.962)	106	50	15.041 (4.711-48.018)

a: GMTs de soros reunidos consistiu de volumes iguais de soro de cada coelho individual dentro de um grupo

b: Estatisticamente diferente (p = 0,022) do grupo de tratamento sem ALPO₄

Tabela 4. OPA GMTs de *S. pneumoniae* para Pools de Soro de Coelho NZW Depois de Imunização com Duas Doses de Glicoconjugado Pneumocócico 13-valente

Sorotipo	<u>13vPnC^a</u>			<u>13vPnC + ALPO₄^a</u>		
	Semana 0	Semana 4	Proporção de Semana 4 : Semana 0	Semana 0	Semana 4	Proporção de Semana 4 : Semana 0
1	<8	64	16	<8	64	16
3	<8	8	2	<8	16	4
4	<8	16	4	<8	32	8
5	<8	128	32	<8	512	128
6A	8	128	16	8	512	64
6B	<8	256	64	8	1.024	128
7F	8	64	8	8	128	16
9V	8	64	8	8	128	16
14	16	32	2	16	32	2
18C	8	256	32	<8	256	64
19A	<8	256	64	<8	1.024	256
19F	<8	128	32	<8	512	128
23F	8	64	8	<8	256	64

A: Os pools consistiram de volumes iguais de soro de coelhos individuais dentro de um grupo de tratamento (n = 12)

Estudo nº HT01-0036

O estudo nº HT01-0036 comparou reações imunes de coelho com os polissacarídeos (PSs) contidos na vacina, depois de imunização com a vacina 13vPnC com ou sem conjugação com a proteína CRM₁₉₇. Coelhos New Zealand White foram imunizados por via intramuscular na semana 0 e na semana 2 com uma dose de 2,2 µg de cada PS (exceto 4,4 µg de 6B). Os animais receberam uma de três preparações de vacina: (a) 13vPnC (PS diretamente conjugado a CRM₁₉₇), (b) 13vPnPS, (PS livre) ou (c) 13vPnPS + CRM₁₉₇ (PS livre misto com CRM₁₉₇). Todas as preparações de vacina continham AIPO₄ como o adjuvante em 125 µg/ dose.

Reações imunes específicas do sorotipo para todas as preparações de vacina foram avaliadas em um ELISA de IgG e OPA mediado pelo complemento medindo anticorpos funcionais. As reações imunes foram comparadas entre os grupos de tratamento.

A Tabela 5 apresenta dados de GMT obtidos de sangrias da semana 4 analisadas em ELISAs de IgG antígeno específicas. Análises adicionais mostram a proporção de valores de GMT na semana 4 para a semana 0. Os dados indicam que a preparação de vacina conjugada provocou títulos séricos de IgG maiores do que PS ou vacina de CRM₁₉₇ +PS livre. Com a exceção de *S. pneumoniae* tipo 14, a vacina 13vPnC foi capaz de induzir anticorpos funcionais para as cepas típicas de *S. pneumoniae* em um OPA (Tabela 6). Depois de duas imunizações com ou a vacina 13vPnPS ou 13vPnPS + CRM₁₉₇, nenhuma pode induzir títulos OPA ≥ 8 vezes na semana 4 em relação à semana 0 para 10 dos 13 sorotipos medidos (Tabela 6).

Em conclusão, estes resultados indicam que a conjugação dos polissacarídeos da vacina pneumocócica 13-valente produz maiores títulos séricos de IgG e maior atividade de anticorpos funcionais global do que a vista com polissacarídeo livre somente ou misto com CRM₁₉₇ não conjugado.

Tabela 5. Reações de IgG de Coelho (GMTs) a PnPS por ELISA Depois de Imunização com Duas Doses de Glicoconjugado Pneumocócico 13-valente

Sorotipo	<u>13vPnPS</u>			<u>13vPnPS = CRM₁₉₇</u>			<u>13vPnC</u>		
	<u>(PS livre)</u>			<u>(PS mixed com CRM₁₉₇)</u>					
	Semana 0	Semana 4	Proporção	Semana 0	Semana 4	Proporção	Semana 0	Semana 4	Proporção
	(95% CI)	(95% CI)	Semana 4 : Semana 0	(95% CI)	(95% CI)	Semana 4 : Semana 0	(95% CI)	(95% CI)	Semana 4 : Semana 0
1	378	2.290	5,8	395	1.959	5,0	472	35.970	76,2
		(843-5.790)			(809-4.739)			(29.130-44.417)	
3	57	240	4,2	89	163	1,8	50	10.414	208,3
		(64-908)			(74-358)			(10.414-16.676)	
4	50	379	7,6	50	607	12,1	50	12.890	257,8
		(150-959)			(313-1.178)			(9.117-18.224)	
5	343	226	4,5	50	321	6,4	50	35.264	705,3
		(113-450)			(147-701)			(24.467-50.824)	
6A	154	466	3,0	98	210	2,1	163	234.245	1.437,1
		(316-688)			(95-464)			(167.152-328.283)	
6B	63	727	11,6	62	745	12,0	131	33.599	256,5
		(384-1.375)			(384-1.440)			(22.934-49.222)	

Tabela 5. –continuação–

Sorotipo	<u>13vPnPS</u> (PS livre)			<u>13vPnPS = CRM¹⁹⁷</u> (PS mixed com CRM ¹⁹⁷)			<u>13vPnC</u>		
	Semana 4		Proporção	Semana 4		Proporção	Semana 4		Proporção
	Semana 0	(95% CI)	Semana 4 : Semana 0	Semana 0	(95% CI)	Semana 4 : Semana 0	Semana 0	(95% CI)	Semana 4 : Semana 0
7F	50	61 (39-95)	1,2	50	72 (47-111)	1,4	50	35.702 (24.350-52.347)	714,0
9V	50	104 (48-195)	2,1	55	169 (74-390)	3,0	50	50.033 (34.765-72.007)	1.000,7
14	66	298 (117-757)	4,5	50	195 (71-535)	3,9	50	20.121 (12.087-32.138)	402,4
18C	89	1.555 (655-3.688)	17,5	66	761 (300-1.935)	11,5	101	71.451 (32.745-124.641)	707,4
19A	50	89 (44-179)	1,8	50	80 (39-163)	1,6	50	23.485 (12.857-42.723)	469,7
19F	61	1.362 (559-3.317)	22,3	61	991 (370-2.654)	16,3	67	19.358 (12.553-33.173)	288,9
23F	73	1.085 (487-2.420)	14,9	121	638 (311-1.311)	5,3	68	45.972 (25.134-84.089)	676,1

Tabela 6. Títulos de *S. pneumoniae* OPA para Grupos Séricos de Coelho Depois de Imunização com Duas Doses de Vacinas Pneumocócicas 13-valentes

Sorotipo	Títulos de OPA						
	Sem Tratamento	13vPnPS (PS livre)	13vPnPS + CRM ₁₉₇	13vPnC			
	Semana 0 ^a	Semana 4	Proporção Semana 4: Semana 0	Semana 4 (PS livre misturado com CRM ₁₉₇)	Proporção Semana 4: Semana 0	Semana 4	Proporção Semana 4: Semana 0
1	4	16	4	16	4	8	32
3	4	4	1	4	1	4	8
4	4	4	1	4	1	4	64
5	4	32	8	16	4	16	64
6A	8	64	8	32	4	32	664
6B	8	64	8	32	4	32	32
7F	16	32	2	16	1	16	16
9V	16	16	1	32	2	32	8
14	16	16	1	16	1	16	2
18C	4	16	4	16	4	8	64
19A	8	8	1	8	1	16	64
19F	4	4	1	4	1	8	64
23F	16	32	2	16	1	32	32

a: Usado como valores da semana 0 para todos os grupos

Exemplo 17

Procedimento Alternativo para Conjugação de Sacarídeo Pneumocócico Sorotipo 19A – CRM₁₉₇

Visão Geral

5 O exemplo seguinte descreve um processo para produzir um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo. Em geral, depois de oxidação por periodato (ativação) para gerar grupamentos aldeído reativos sobre o polissacarídeo, o polissacarídeo sorotipo 19A foi coliofilizado com a proteína de veículo e foi realizada conjugação em dimetil sulfóxido (DMSO) através de um mecanismo de aminação redutiva na presença de cianoboro-hidreto de sódio. Ao contrário dos processos de conjugação envolvendo discreta liofilização de polissacarídeos e proteínas de veículo em DMSO, ou processos envolvendo coliofilização aquosa de polissacarídeos e proteínas de veículo sem DMSO, o aprimoramento do processo seguinte proporcionou aprimorada eficiência da conjugação e controle sobre a estabilidade dos polissacarídeos sorotipo 19A conforme medido pelo tamanho molecular e pela percentagem de sacarídeo livre. Embora este processo seja descrito para o polissacarídeo sorotipo 19A, este processo também pode ser usado para sorotipos que são estruturalmente similares ao sorotipo 19A, tais como 6A, 6B, e 19F os quais também contêm ligações fosfodiéster entre suas unidades de repetição.

Ativação

25 Recipientes de polissacarídeo sorotipo 19A foram degelados e combinados em um vaso de reação. Foram realizadas reações de oxidação em acetato de sódio a 10 mM (pH 5) pela adição de tampão de acetato de sódio a 100 mM (pH 5) em uma concentração de polissacarídeo de 2 mg/mL. Foi realizada oxidação na presença de periodato de sódio por incubação em 23 ± 2 °C por 16 a 24 horas com centrifugação a 150 rpm.

Purificação de Polissacarídeo Ativado

30 Concentração e diafiltração do polissacarídeo ativado sorotipo 19A foi realizada com cassetes de ultrafiltração de 0,093 m² (1 ft²) de polis-

sulfona Pall Centramate de 30K ou 100K de MWCO. Foi usado um estímulo de membrana alvo de 2 gramas de polissacarídeo por 0,093 m² (ft²) de área de membrana para purificação do polissacarídeo ativado. O sistema de ultra-filtração foi equilibrado em tampão de acetato de sódio a 10 mM (pH 5) antes da adição da solução da reação de oxidação. A solução da reação de oxidação foi então concentrada e diafiltrada contra acetato de sódio a 10 mM (pH 5). O polissacarídeo ativado foi então armazenado em 5 ± 3°C por até 14 dias antes do material ser combinado para liofilização.

Processo de Coliofilização e Conjugação

O pH do polissacarídeo ativado sorotipo 19A foi ajustado para pH 6,5 ± 0,2 pela adição de fosfato de sódio a 1 M dibásico. O polissacarídeo ativado foi combinado com sucrose em uma proporção de 25 gramas de sucrose por grama de polissacarídeo, seguida por combinação com CRM₁₉₇ em uma proporção de 0,8 sacarídeo / proteína. Depois de congelamento com revestimento (*shell freezing*), os frascos de vidro de 100 mL foram dispostos em armazenamento em -25°C.

Os frascos de polissacarídeo / CRM₁₉₇ coliofilizados foram removidos do freezer a -25°C e deixados para equilibrar até a temperatura ambiente em uma coifa de fluxo laminar. Os frascos foram amostrados aleatoriamente para análise da umidade. Dissolução do material de polissacarídeo ativado / CRM₁₉₇ coliofilizado em DMSO foi realizada a 2 mg/mL nos frascos de liofilização. A solução de polissacarídeo ativado / CRM₁₉₇ DMSO foi então transferida para o vaso de conjugação e agitada por 60 a 75 min em 23 ± 2°C a 70 a 120 rpm. Com agitação, um equivalente molar de ciano-boro-hidreto de sódio foi então adicionado, seguido por 1% de WFI. A solução da reação foi então agitada em 23 ± 2°C por 8 a 16 horas. Um equivalente molar de boro-hidreto de sódio foi adicionado ao vaso de conjugação para a reação de capeamento e a solução foi agitada em 23 ± 2°C por 3 a 16 horas. A solução da reação foi em seguida diluída 10 vezes em cloreto de sódio a 0,9% frio (2 a 8°C).

A solução da reação diluída 10 vezes foi passada através de um filtro de 1,2/5,0 µm e em seguida concentrada até 1 a 2 g/L sobre um sis-

tema de ultrafiltração equipado com with uma membrana de $0,093 \text{ m}^2$ (1 ft^2) de celulose regenerada de 300 K ou 1000 K de MWCO. Um estímulo de filtro de 1 a 2 gramas de polissacarídeo por $0,093 \text{ m}^2$ (1 ft^2) de área de membrana foi usado para a purificação. Em seguida foi realizada uma diafiltração de 10X da solução do conjugado contra cloreto de sódio a 0,9%. Na limpeza da membrana, uma diafiltração de 30X da solução do conjugado foi em seguida realizada contra tampão a 5 mM de succinato de sódio / 0,9% de cloreto de sódio (pH 6). O conjugado purificado foi então passado através de um filtro de $0,22 \mu\text{m}$ e foram removidas amostras para experimentação pré-FBC. A solução do conjugado foi então armazenada em $5 \pm 3^\circ\text{C}$ por até 30 dias até preparação do Concentrado da Massa Final (FBC).

Preparação do Concentrado da Massa Final

A solução do conjugado pré-FBC foi diluída até uma concentração alvo de 0,5 g/L usando tampão a 5 mM de succinato de sódio / 0,9% de cloreto de sódio. A solução foi misturada com agitação magnética por aproximadamente 15 minutos e em seguida passada através de um filtro de $0,22 \mu\text{m}$ para dentro de frascos de FBC de polipropileno estéreis. A solução do conjugado de FBC foi então armazenada em $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

Foi realizada caracterização do conjugado conforme descrito no Exemplo 4.

Coliofilização vs. Discreta Liofilização em DMSO

Foram produzidos doze lotes de 1 a 6 gramas de conjugado de sorotipo 19A, com seis produzidos usando o método de co-liofilização com DMSO descrito acima e seis produzidos usando um método de discreta liofilização com DMSO conforme descrito no Exemplo 8 acima. Foi realizada caracterização do conjugado conforme descrito no Exemplo 4, incluindo o uso de meios de cromatografia de exclusão de tamanho (CL-4B) para traçar o perfil da distribuição de tamanho molecular relativo do conjugado e uma prova de ácido urônico para medir a concentração de sacarídeo. Com respeito à estabilidade de longo termo do conjugado de sorotipo 19A, uma redução no tamanho molecular de cerca de 10% com um aumento concomitante nos níveis de sacarídeo livre de cerca de 10% é esperada durante um

período de 18 meses. Por conseguinte, na produção de conjugados do sorotipo 19A, um valor preferencial para tamanho molecular do conjugado é cerca de 70% de 0,3 Kd, com um nível de sacarídeo livre preferencial abaixo de cerca de 20 a 25%.

- 5 Conforme mostrado na Tabela 7, a caracterização dos conjugados de sorotipo 19A produzidos por ambos os métodos mostrou que o processo de coliofilização proporcionou características de conjugado significativamente aprimoradas em termos tanto de tamanho molecular bem como da percentagem de sacarídeo livre comparado com o processo de discreta liofilização.
- 10

Tabela 7. Comparações de Características de Conjugado Chave para Coliofilização do Sorotipo 19A em DMSO vs. Discreta Liofilização

Característica	Coliofilização (n = 6)		Discreta Liofilização (n = 6)	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
% 0,3 Kd (CL-4B) sacarídeo	67	7,2	58	13,0
Sacarídeo Livre (%)	<18	<3,5	31	9,2

- Deve ser entendido que a discussão e os exemplos precedentes simplesmente apresentam uma descrição detalhada de algumas modalidades. Portanto deve ser evidente para aqueles com conhecimento regular da técnica que várias modificações e equivalentes podem ser produzidos sem se afastar do espírito e do âmbito da invenção.
- 15

- Todos os artigos de periódicos, outras referências, patentes e requerimentos de patente que são identificados neste requerimento de patente são incorporados por meio de referência em sua totalidade.
- 20

REFERÊNCIAS

1. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:100-21.
- 5 2. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:122-40.
3. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *New Engl J Med* 2003; 348(18):1737-46.
- 10 4. Black S, Shinefield H, Hansen J, et al. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:1105-7.
- 5 15 5. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 2001; 285:1729-35.
6. Butler J, Breiman R, Lipman H, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994. *J Infect Dis* 1995; 171:885-9.
- 20 7. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multi-drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343:1917-24.
- 25 8. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM, et al. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N Engl J Med* 1995; 333:481-6.
9. Joloba ML, Windau A, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Hausdorff WP, Jacobs MR. Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates and the antimicrobial susceptibility of such isolates in children with otitis media. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1489-94.
- 30 10. Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety, and immunoge-

- nicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:187-95.
11. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. *J Infect Dis* 2000; 182:490-6.
 12. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: implications for vaccine strategies. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:503-10.
 13. Fagan RL, Hanna JN, Messer RD, Brookes DL, Murphy DM. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in children in Far North Queensland. *J. Paediatr Child Health* 2001; 37:571-5.
 14. Kertesz DA, Di Fabio JL, de Cunto Brandileone MC, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1355-61.
 15. Hausdorff W, Siber G, Paradiso P. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357:950-52.
 16. Buckingham SC, King MD, Miller ML. Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:499-504.
 17. Byington C, Spencer L, Johnson T, et al. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. *Clin Infect Dis* 2002; 34:434-40.
 18. Tan T, Mason E, Wald E, et al. Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 2002; 110:1-6.
 19. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, et al. Pneumococcal serotypes from acute otitis media in rural Kentucky. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:859-65.

20. Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, et al. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:1008-16.
21. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 1983; 148:1136-59.
22. Nahm MH, Olander JV, Magyarlaki M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 176:698-703.
23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH. Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants. *J Infect Dis* 1999; 180:1569-76.
24. Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H. Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines, in infants. *J Infect Dis* 2001; 184:789-93.
25. Ekstrom N, Kilpi T, Lahdenkari M, Lehtonen H, Ahman H, Kayhty, H. Immune response to cross-reacting pneumococcal serotypes 6A/6B and 19A/19F in the FinOM vaccine trial, Third World of Congress of Pediatric Infectious Diseases, Santiago, Chile, November 19-23, 2003.
26. Penn RL, Lewin EB, Douglas RG, Jr., Schiffman G, Lee CJ, Robbins JB. Antibody responses in adult volunteers to pneumococcal polysaccharide types 19F and 19A administered singly and in combination. *Infect Immun* 1982; 36:1261-2.
27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebler CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis* 1996; 173:119-27.
28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfssdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Strep-*

- Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001; 183:253-60.
29. Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I. Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity in serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model. *Infect Immun* 2003; 71:2956-9.
 30. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349:1341-8.
 31. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, et al. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 2003; 362:355-61.
 32. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344:403-9.
 33. Pilishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A, et al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Abst G-1079, ICAAC, Chicago, IL, 2003.
 34. Patente dos Estados Unidos Nº 4.673.574.
 35. Patente dos Estados Unidos Nº 4.902.506.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo, o método compreendendo:
 - 5 (a) reagir polissacarídeo sorotipo 19A purificado com um agente oxidante resultando em um polissacarídeo sorotipo 19A ativado;
 - (b) combinar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado com uma proteína de veículo;
 - (c) coliofilizar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e
 - 10 proteína de veículo; –
 - (d) ressuspender o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo em dimetil sulfóxido (DMSO);
 - (e) reagir o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo com um agente redutor resultando em um conjugado de
 - 15 polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo; e
 - (f) rematar aldeídos não reagidos no conjugado de polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo resultando em um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo.
- 20 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína de veículo é CRM₁₉₇.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o polissacarídeo sorotipo 19A ativado e CRM₁₉₇ são combinados em uma proporção de 0,8:1.
- 25 4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o pH do polissacarídeo sorotipo 19A ativado é ajustado para $6,5 \pm 0,2$ antes de combinar com a proteína de veículo.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polissacarídeo sorotipo 19A ativado é combinado com sucrose antes de combinar
- 30 com a proteína de veículo.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente purificar o conjugado imunogênico.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agente oxidante é periodato de sódio.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agente redutor é cianoboro-hidreto de sódio.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 1, em que rematar aldeídos não reagidos compreende reagir o conjugado de polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo com boro-hidreto de sódio.

10 10. Método para produzir um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo, o método compreendendo:

(a) reagir polissacarídeo sorotipo 19A purificado com periodato de sódio resultando em um polissacarídeo sorotipo 19A ativado;

15 (b) ajustar o pH do polissacarídeo sorotipo 19A ativado para 6,5 $\pm$ 0,2;

(c) combinar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado com sucrose;

(d) combinar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado com uma proteína de veículo em uma proporção de 0,8:1;

20 (e) coliofilizar o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo;

(f) ressuspender o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo em dimetil sulfóxido (DMSO);

25 (g) reagir o polissacarídeo sorotipo 19A ativado combinado e proteína de veículo com cianoboro-hidreto de sódio resultando em um conjugado de polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo; e

30 (h) rematar aldeídos não reagidos no conjugado de polissacarídeo sorotipo 19A : proteína de veículo com boro-hidreto de sódio resultando em um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína de veículo é CRM₁₉₇.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente purificar o conjugado imunogênico.

13. Método para produzir um conjugado imunogênico compreendendo um polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo em que o referido polissacarídeo compreende uma ligação fosfodiéster entre unidades de repetição, o método compreendendo:

(a) reagir o referido polissacarídeo com um agente oxidante resultando em um polissacarídeo ativado;

(b) combinar o polissacarídeo ativado com uma proteína de veículo;

(c) coliofilizar o polissacarídeo ativado combinado e proteína de veículo;

(d) ressuspender o polissacarídeo ativado combinado e proteína de veículo em dimetil sulfoxido (DMSO);

(e) reagir o polissacarídeo ativado combinado e proteína de veículo com um agente redutor resultando em um conjugado de polissacarídeo : proteína de veículo; e

(f) rematar aldeídos não reagidos no conjugado de polissacarídeo : proteína de veículo resultando em um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* encadeado de modo covalente a uma proteína de veículo.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que o referido polissacarídeo compreendendo uma ligação fosfodiéster entre unidades de repetição é polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 19A, 19F, 6A, ou 6B.

15. Método de acordo com a reivindicação 13, em que a proteína de veículo é CRM₁₉₇.

Alterações nas Taxas de Doenças Pneumocócicas Invasivas por Sorotipo em Crianças dos Estados Unidos <2 anos de idade a partir da Linha Basal (1998/1999) até 2001 (ABCs Surveillance)

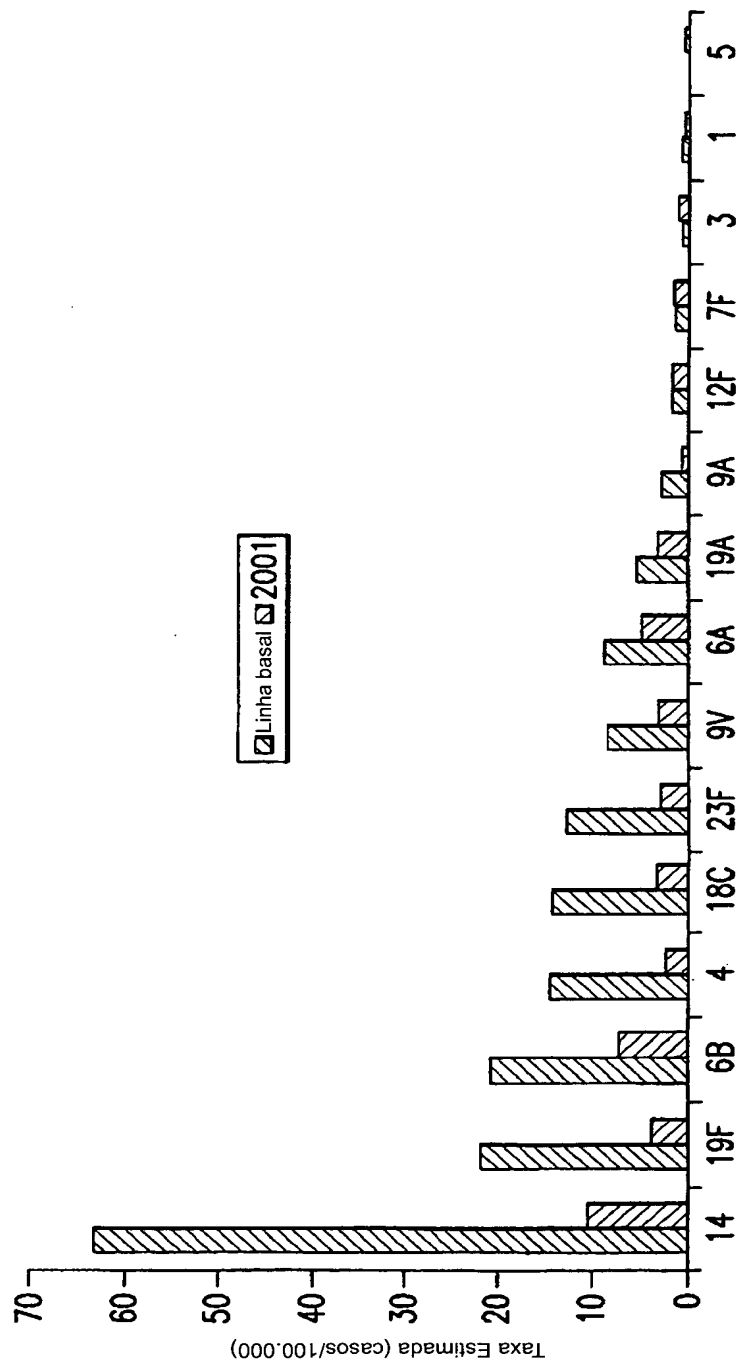


FIG.1

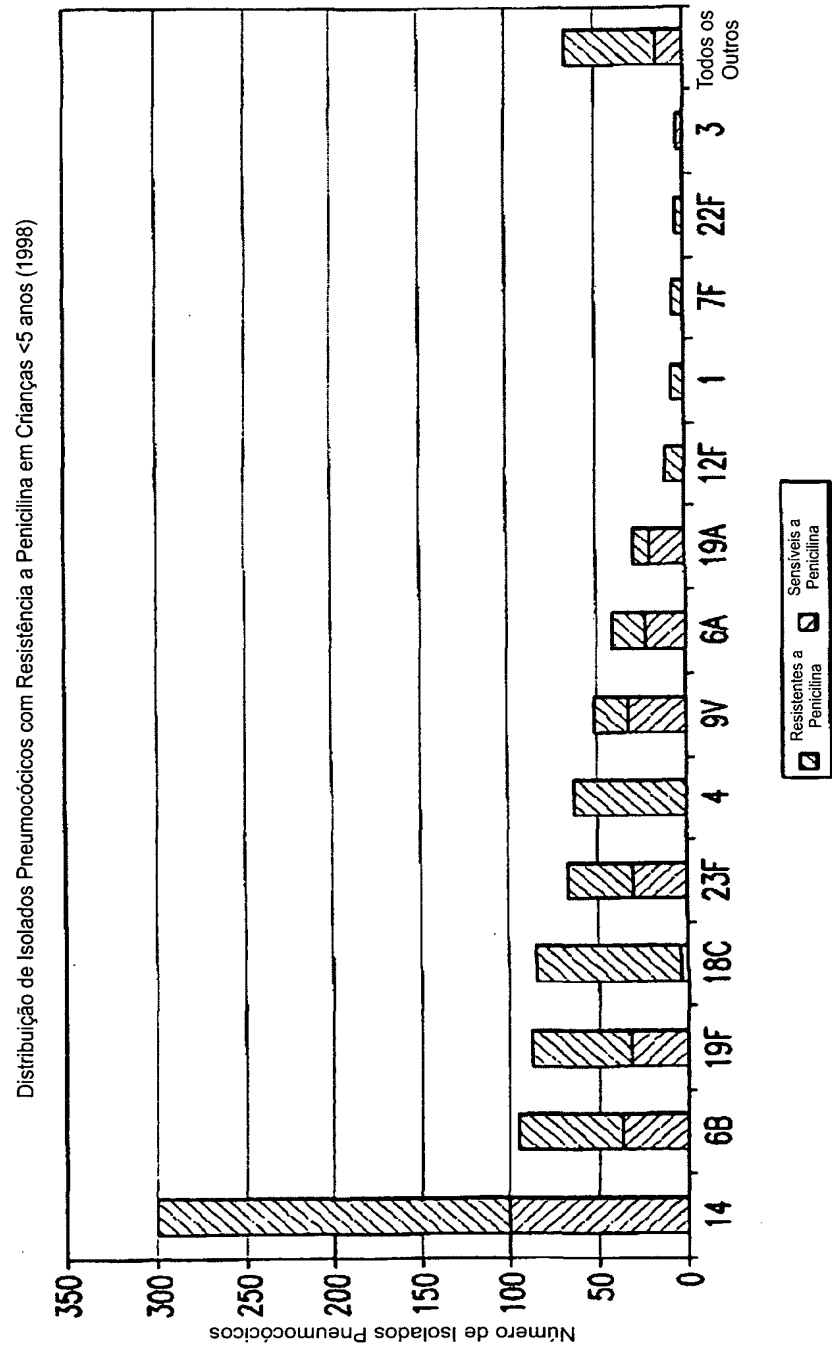


FIG.2

Curvas de Distribuição Cumulativa Reversa de Resultados Pós-Terceira Dose de OPA da Coorte da Prova de Prev(e)nar D118-P16 Recebendo um Lote de Escala de Fabricação de Prev(e)nar® (n = 98)

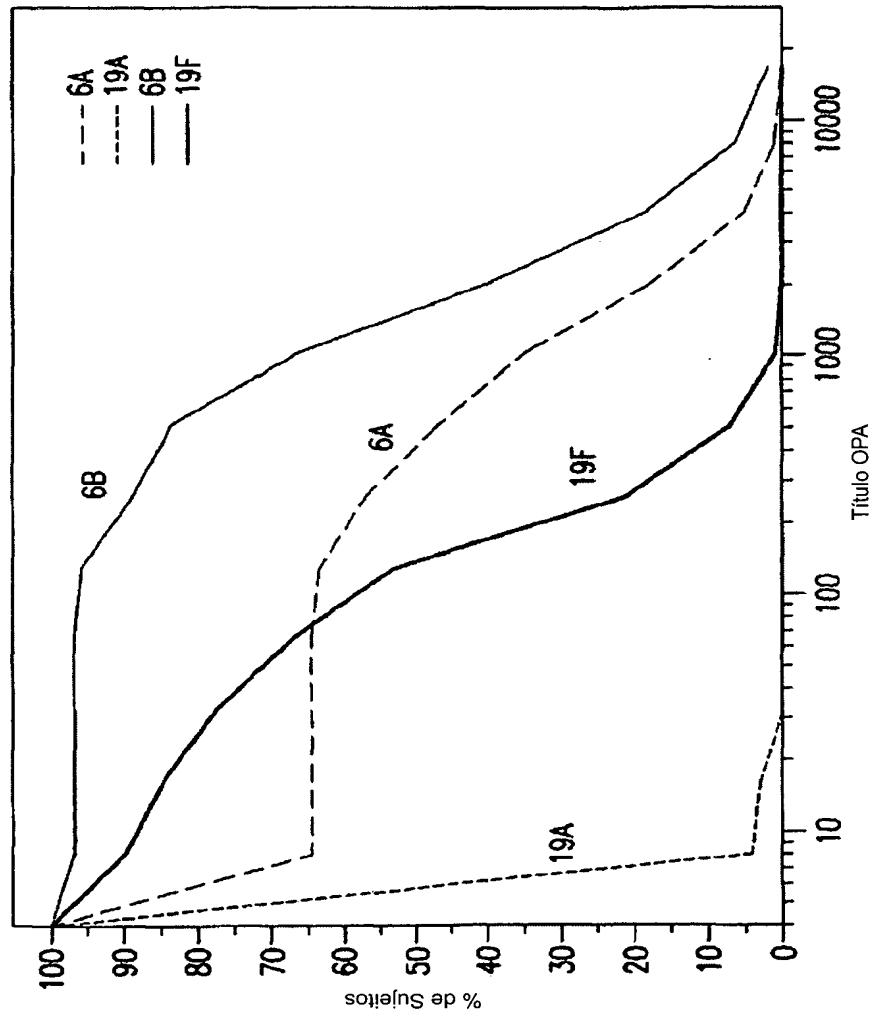


FIG.3

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÃO DE CONJUGADO DE POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA PNEUMOCÓCICO MULTIVALENTE**".

5 A presente invenção refere-se a uma composição imunogênica tendo 13 conjugados de polissacarídeo-proteína distintos e opcionalmente, um adjuvante à base de alumínio. Cada conjugado contém um polissacarídeo capsular preparado a partir de um sorotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F) conjugado a uma proteína de veículo. A composição imunogênica, formulada como
10 uma vacina, aumenta a cobertura contra doença pneumocócica em bebês e crianças pequenas globalmente, e proporciona cobertura para os sorotipos 6A e 19A que não é dependente das limitações de proteção cruzada do sorogrupo. Também são proporcionados métodos para produzir um conjugado imunogênico compreendendo polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae*
15 sorotipo 19A nos quais o polissacarídeo sorotipo 19A é coliofilizado com uma proteína de veículo e a conjugação é realizada em dimetil sulfóxido (DMSO) através de um mecanismo de aminação redutiva.