



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

(11) PI 0413323-4 B1



(22) Data do Depósito: 06/08/2004

(45) Data de Concessão: 10/09/2019

(54) Título: MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VACINA MENINGOCÓCICA CONJUGADA AO TOXÓIDE TETÂNICO EM VOLUMES COMERCIAIS

(51) Int.Cl.: C07D 209/04; C07D 265/30; C07D 295/13; C07D 411/12; C07D 413/12; (...).

(30) Prioridade Unionista: 06/08/2003 US 60/493.389.

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

(72) Inventor(es): ELLEN JESSOUROUN; IVNA ALANA FREITAS BRASILEIRO DA SILVEIRA; RENATA CHAGAS BASTOS; CARL E. FRASCH; CHE-HUNG ROBERT LEE.

(86) Pedido PCT: PCT US2004026431 de 06/08/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/037320 de 28/04/2005

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

(57) Resumo: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VACINAS CONJUGADAS DE POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA". Métodos para a preparação de vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína em produção elevada, são fornecidos. Os métodos envolvem a reação de um grupo de hidrazida em um reagente com um grupo de aldeído no outro reagente. A reação prossegue rapidamente com uma eficiência elevada de conjugação. Os processos de purificação simplificados podem ser empregados para separar o produto conjugado do polissacarídeo e proteína não conjugados e outros subprodutos de molécula pequena.

“MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VACINA MENINGOCÓCICA CONJUGADA AO TOXÓIDE TETÂNICO EM VOLUMES COMERCIAIS”

Campo da Invenção

Os métodos para a preparação de vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína em produção elevada, são fornecidos. Os métodos envolvem a reação de um grupo de hidrazida em um reagente com um grupo de aldeído em outro reagente. A reação prossegue rapidamente com uma eficiência de conjugação elevada. Os processos de purificação simplificados podem ser empregados para separar o produto conjugado do polissacarídeo e proteína não conjugados e outros subprodutos de molécula pequena.

Antecedentes da Invenção

Os polissacarídeos bacterianos (PSs) são antígenos independentes de T induzindo imunidade em curto prazo em crianças mais velhas, e adultos, porém frequentemente não em bebês. Os PSs são incapazes de se ligarem às maiores moléculas do complexo de histocompatibilidade, que é requerido para apresentação de antígeno a, e estimulação de linfócitos auxiliares T. Os PSs são capazes de estimular os linfócitos B para a produção de anticorpos sem a ajuda de linfócitos auxiliares T. Como um resultado da estimulação independente T dos linfócitos B, há uma carência da indução de memória seguindo a imunização por esses antígenos.

Os antígenos de polissacarídeos independentes de T podem ser convertidos para antígenos dependentes de T por ligação covalente dos polissacarídeos às moléculas de proteínas. As células B que ligam o componente de polissacarídeo

da vacina conjugada podem ser ativadas por célula T auxiliares específicas para peptídeos que são uma parte da proteína portadora conjugada. A resposta T auxiliar a proteína portadora serve para aumentar a produção de anticorpo pelo polissacarídeo. As vacinas conjugadas de PS, são híbridos de polissacarídeo-proteína formados pela ligação covalente de uma proteína a um PS. A modificação química do PS antes da ligação é tipicamente requerida por que a maioria dos PSs bacterianos nativos não podem ser quimicamente ligados a uma proteína sem primeiro passar por alguma modificação química ("ativação").

A ligação à proteína produz vários epítomos de célula T. Esses epítomos de célula T interagem com células T auxiliares CD4, grandemente facilitando uma resposta de anticorpo ao polissacarídeo ligado. A resposta dependente de célula auxiliar T a um conjugado resulta em ambos anticorpos IgG de soro e memória imune, mesmo em bebês. Adicionalmente, a imunogenicidade do conjugado de PS, em contraste com o PS nativo, é menos dependente do tamanho do PS conjugado. Conseqüentemente, os conjugados preparados ou com PS ou com oligossacarídeos podem ter imunogenicidade similar.

Existem muitas reações de conjugação que têm sido empregadas para covalentemente ligar os polissacarídeos às proteínas. Três dos métodos mais comumente empregados incluem: (1) aaminação redutiva, onde o grupo de aldeído ou cetona em um componente da reação reage com o grupo de amino ou hidrazida no outro componente, e a ligação dupla C=N formada é subseqüentemente reduzida para ligação única C-N por um a-

11

gente de redução; (2) conjugação de cianilação, onde o polissacarídeo é ativado ou por brometo de cianogênio (CNBr) ou por tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamonio piridíneo (CDAP) para introduzir um grupo de cianato ao grupo de hidroxila, que forma uma ligação covalente ao grupo de amino ou hidrazida sob adição do componente de proteína; e (3) uma reação de carbodiimida, onde a carbodiimida ativa o grupo de carboxila em um componente da reação de conjugação, e o grupo de carbonila ativada reage com o grupo de amino ou hidrazida no outro componente. Essas reações são também frequentemente empregadas para ativar os componentes do conjugado antes da reação de conjugação.

As vacinas conjugadas de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) representam as primeiras vacinas conjugadas de PS-proteína produzidas para uso clínico. Robbins e seus colegas em 1980 utilizaram o processo biotecnológico de quimicamente ligar os sacarídeos aos portadores de proteína, um conceito desenvolvido há 50 anos atrás. Observe Avery e outros, J. Exp. Med. 1929; 50:533-550; Schneerson e outros, J. Exp. Med. 1980; 152:361-376. Existem agora quatro vacinas conjugadas de Hib diferentes licenciadas nos Estados Unidos, cada diferente, e cada tendo suas próprias características físicas, químicas e imunológicas, como sumarizado na Tabela 1. Uma revisão detalhada do produto químico de conjugação e controle de qualidade empregados nessas vacinas tem sido publicada. Observe Kniskern e outros, "Conjugation: design, chemistry, and analysis" em Ellis e outros, Development and Clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines, Nova

York: Marcel Dekker, 1994: 37-69.

Tabela 1

Vacina*	Tamanho do Sa-carídeo	Proteína Porta-dora	Espaçador (Li-gador)
PRP-D (Connaught)	Polissacarídeo	Toxóide de difte-ria	Espaçador de 6 carbonos (ADH)
HbOC (Wyeth-Lederle)	Oligossacarídeo	Proteína de difteria (CRM)	Nenhum (Amida)
PRP-OMPC (Merck)	Polissacarídeo pequeno	Proteína meningocócica	Tioéter (bigenérico)
PRP-T (Aventis Pasteur)	Polissacarídeo	Toxóide de tétano	Espaçador de 6 carbonos (ADH)

* As quatro vacinas conjugadas de Hib são descritas comumente na literatura com essas acrossemias, e os fabricantes
5 responsáveis estão em parênteses.

O primeiro conjugado de Hib comercial, conjugado de toxóide de difteria de fosfato de poliribosilribitol (PRP-D), consiste de PS de Hib de tamanho parcialmente reduzido ligado através de um espaçador de seis carbonos, diidrazida de ácido adípico (ADH), ao toxóide de difteria empregando o procedimento de Schneerson e outros, J. Exp. Med.
10 1980; 152: 361:376. O derivado de ADH de toxóide de difteria foi obtido neste método por reação com ADH na presença de cloridrato de carbodiimida de 1-[3-(dimetilamino)-propil]-3-
15 etila (EDC). O PS de Hib foi então ativado criando-se grupos

A3

de cianato nos grupos de hidroxila empregando CNBr. O PS ativado foi conjugado ao ADH-toxóide (conjugação de cianilação), porém o processo criou uma ligação instável e o conjugado teve problemas na solubilidade.

5 O produto químico de conjugação de Robbins foi modificado mais tarde tal que o espaçador de ADH tenha sido adicionado primeiro ao polissacarídeo, que é então conjugado à proteína purificada na presença de EDC (reação de carbodiimida). Observe Chu e outros, *Infect. Immun.* 1983; 40: 245-10 256; Schneerson e outros, *Infect. Immun.* 1986, 52:519-528. Esta modificação melhorou a eficiência da conjugação e solubilidade do produto. O conjugado de proteína de tétano de fosfato de poliribosilribitol (PRP-T) utiliza o produto químico melhorado para covalentemente ligar o polissacarídeo de 15 Hib ao toxóide de tétano (observe a Tabela 1).

A vacina conjugada de toxóide de difteria de mutante de reação cruzada de fosfato de poliribosilribitol (PRP-CRM), também referido como conjugado de oligossacarídeo de *Haemophilus b* (HbOC), não contém PS de Hib. Ao contrário, 20 ela utiliza os oligossacarídeos de cerca de 20 unidades de repetição derivados por oxidação de periodato da funcionalidade de glicol na porção de ribitol. Os oligossacarídeos oxidados são então ligados diretamente a CRM₁₉₇, uma forma mutante não tóxica de toxina de difteria isolada de culturas 25 de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197), na presença de cianoboroidreto de sódio (aminação redutiva). Observe, Anderson e outros, *J. Immunol.* 1989; 142:2464-8; e Anderson, *Infect. Immun.* 1983, 39:233-238. Neste método de conjugação, a

relação de oligossacarídeo para proteína foi constatada ser crítica para resposta de anticorpo ideal. Observe, Kniskern e outros, "Conjugation: design, chemistry, and analysis" em Ellis e outros, Development and Clinical uses de *Haemophilus b* conjugate vaccines. Nova York: Marcel Dekker, 1994: 37-69; Anderson e outros, J. Immunol. 1989; 142:2464-8.

Comparada com outras vacinas conjugadas de Hib, a vacina conjugada de complexo de proteína de membrana externa de polissacarídeo de Hib-*Neisseria meningitidis* (PRP-OMPC) tem várias propriedades únicas. O portador da proteína não é um componente da vacina de difteria, tétano e coqueluche (DTP), porém consiste de vesículas de membrana externa meningocócicas desprovidas de lipopolissacarídeo às quais estão ligadas ao PS de Hib de tamanho reduzido através de uma ligação de tioéter. Observe Marburg, e outros, J. Amer. Chem. Soc. 1986; 108-5282-5287; Kniskern e outros, "Conjugation: design, chemistry, and analysis" em Ellis e outros, Development and Clinical uses de *Haemophilus b* conjugate vaccines. Nova York: Marcel Dekker, 1994: 37-69; Anderson e outros, J. Immunol. 1989; 142:2464-8. Neste processo, os ligadores separados são ligados a ambas as proteínas e polissacarídeos de Hib, seguido por fusão dos ligadores para formar uma ligação de tioéter.

Neisseria meningitidis é uma causa principal da sépsis e meningite bacteriana em todo o mundo. Os meningococos patogênicos são envelopados por uma cápsula de polissacarídeo que está ligada à superfície da membrana externa do organismo. Treze sorogrupos diferentes de meningococos foram

identificados com base na especificidade imunológica do polissacarídeo capsular. Observe Frasch e outros, 1985. Desses treze sorogrupos, cinco causam a maioria das doenças meningocócicas; esses incluem os sorogrupos A, B, C, W135, e Y. O sorogrupo A é responsável pela maioria das doenças epidêmicas. O sorogrupo B, C e Y causam a maioria das doenças endêmicas e erupções localizadas. A defesa do hospedeiro do meningococo invasivo é dependente da bacteriólise mediada por complemento. Os anticorpos do soro que são responsáveis pela bacteriólise mediada pelo complemento são direcionados em grande parte contra o polissacarídeo capsular externo. Observe Rosenstein e outros, N. Engl. J. Med., 344:1378-1388, 2001.

Com a exceção do sorogrupo B, as vacinas de segurança de polissacarídeo que induzem a proteção relacionada com a idade estiveram disponíveis por muitos anos. Entretanto, seguindo a administração de vacinas de polissacarídeo, os títulos de anticorpos caem rapidamente e a memória imunológica não é induzida. Observe Jodar e outros, 2000, Biologicals, 28: 193-197.

As vacinas convencionais com base no polissacarídeo meningocócico eliciam uma resposta imune contra o polissacarídeo capsular. Esses anticorpos são capazes de bacteriólise mediada por complemento do meningococo específico do sorogrupo. As vacinas meningocócicas contendo os polissacarídeos capsulares purificados induzem os anticorpos bactericidas do soro protetor em adultos, entretanto eles são pobremente imunogênicos em crianças abaixo de 4 anos de idade

e podem induzir tolerância. Observe Taunary e outros, 1974, *Pediatr. Res.*, 8:429; Gold e outros, 1975, *J. Clin. Invest.*, 56: 1536-1547; Leach e outros, 1997, *J. Infect. Dis.*, 175: 2000-204.

5 Para superar as limitações das vacinas de polissacarídeo e com base no sucesso reconhecido das vacinas de Hib conjugadas, esforços recentes no desenvolvimento de vacinas glicoconjugadas de sorogrupos A e C meningocócicas têm sido reportados. O uso muito difundido das vacinas conjugadas de
10 Hib também protege os grupos de idade não incluídos nos programas de vacinação através da redução do estado de portador e transmissão resultando na imunidade em massa. Observe Pelto-
tola, H. 2000, *Clinical Microbiol. Reviews*, 13: 302-317. Essas vacinas têm sido mostradas imunogênicas e bem toleradas
15 em bebês. A imunidade em longo prazo é melhorada por indução da memória, como demonstrado para o componente de sorogrupo C da vacina conjugada meningocócica AC administrada a bebês
Gambian. Observe Fairley e outros, 1996, *J. infect. Dis.*, 174: 1360-1363; Leach e outros, 1997, *J. Infect. Dis.*,
20 175:200-204.

As vacinas conjugadas de sacarídeo-proteína contra sorogrupos A e C de *N. meningitidis* ou outras bactérias encapsuladas têm provado ser eficazes na redução de doenças humanas causadas por esses patógenos. O acoplamento covalente dos oligo ou polissacarídeos bacterianos, que induz a
25 resposta imune independente de célula T, a imunógenos de proteína dependente de célula T resulta em moléculas que são altamente imunogênicas em bebês e jovens crianças induzindo

17

as respostas de memória. Observe Chu e outros, 1983, Infect. Immun., 40: 245-256; Richmond e outros, 1999, J. Infect. Dis., 179:1569-1572; Peltola, H. 2000, Clinical Microbiol. Reviews, 13:302-317; Ramsay e outros, 2001, Lancet, 357: 5 195-196.

Durante os últimos 5 anos, no Reino Unido, a incidência de doença meningocócica aumentou rapidamente, o que fez com que o desenvolvimento da vacina conjugada meningocócica C fosse aplicado em programas de imunização para todas 10 crianças com idade de 1 a 18 anos. Após provar que uma dose única seria suficiente para afetar e induzir a memória imunológica, em 1999, o Reino Unido tornou-se o primeiro país a introduzir vacinas meningocócicas em seu programa nacional de imunização. Observe o Departamento de Saúde, Londres, 15 1999, PL/CMO/99/2 PL/CNO/99/4 PL/CPHO/99/1; Richmond e outros, 1999, J. Infect. Dis., 179: 1569-1572; Richmond e outros, 2001, J. Infect. Dis., 183: 160-163.

A vacinação infantil com conjugados meningocócicos pode fornecer proteção em longo prazo contra doença. Os ní- 20 veis de anticorpo e memória imunológica foram avaliados em crianças Gambian de 5 anos de idade as quais receberam a vacinação conjugada meningocócica A/C (Men A/C) na infância. Observe MacLennan e outros, 2001, J. Infect. Dis. 183:97-104.

No Brasil, a doença meningocócica ocorre em 1- 25 3/100.000 de habitantes, e é principalmente causada por sorogrupo B (60%) seguido pelo sorogrupo C (40%). Observe Si-fontes e outros, 1997, Arch. Med. Res., 28:41-5. Para obter o controle da doença desde os anos setenta, o Brasil tem

produzido as vacinas de polissacarídeo (A/C) contra *Neisseria meningitidis*. A fim de seguir a melhora tecnológica para as vacinas bacterianas de polissacarídeo, as vacinas de polissacarídeo C-toxóide de tétano e polissacarídeo A-toxóide de tétano têm sido desenvolvidas empregando metodologia de amina-
 5 de tétano têm sido desenvolvidas empregando metodologia de amina-
 ção redutiva como o procedimento inicial. Observe Jennings e outros, 1981, J. Immunol., 127: 1011-1018. O método selecionado foi primeiramente aplicado aos polissacarídeos A e C e tem aplicabilidade potencial a outros polissacarídeos
 10 meningocócicos.

Existem vários métodos que têm sido empregados para a ativação do PS meningocócico e para a conjugação, como
 15 sumarizado na Tabela 2. Cada modo de ativação tem o potencial para alterar os epítomos importantes, mesmo quando relativamente poucos sítios são ativados na molécula de PS. A ativação de periodato do PS meningocócico do grupo C, por exemplo, resulta na quebra da cadeia gerando unidades de sa-
 carídeo menores com grupos de aldeído terminal que podem ser ligados à proteína através da amina-
 20 ção redutiva. Observe Richmond e outros, J. Infect. Dis. 1999; 179:1569-72.

Tabela 2

Método	Tamanho do Sacarídeo	Proteína Portadora	Espaçador	Procedimento	Empregado em humanos
No. 1 Amina- ção Reduti- va	Reduzido	Toxóide de tétano	Nenhum	Forma de aldeído de PS combinado com proteína na presença de cianoboroidreto de	Não

				sódio	
No. 2 Carbo- diimida	Nativo	Toxóide de tétano	Nenhum	PS e proteína combinados na presença de car- bodiimida, em seguida bloquea- dos com etanola- mina.	Não
No. 3 Éster ativo ^a	Oligossa- carídeo	CRM ₁₉₇	Ácido adí- pico	Terminação da redução aminada do oligossacari- deo conjugado à proteína por ácido adípico (NHS) ₂	Sim
No. 4 Amina- ção Reduti- va	Reduzido	CRM ₁₉₇	Nenhum	Forma de aldeído de sacarídeo combinado com proteína na pre- sença de ciano- boroidreto de sódio	Sim
No. 5 Amina- ção Reduti- va	PS De-OAc ^b	Toxóide de tétano	Nenhum	Forma de aldeído de PS combinado com proteína na presença de cia- noboroidreto de sódio	Sim

a. Diéster de N-hidroxisucininimida de ácido adípico

b. PS desacetililado somente reportado para grupo C meningo-

cócico

Os estudos iniciais na produção e otimização dos conjugados meningocócicos do Grupo C foram reportados bem antes da comercialização dos conjugados de Hib. Observe Beu-
5 very e outros, *Infect. Immun.* 1982; 37: 15-22; Beuvery e outros, *Infect. Immun.* 1983; 40:39-45; Beuvery e outros, *J. infect.* 1983; 6:247-55; Jennings, e outros, *J. Immunol.* 1981; 127: 1011-8.

Duas metodologias de conjugação diferentes têm sido
10 do reportadas para quimicamente ligar o PS do grupo C a um portador de proteína. Observe Jennings e outros, *J. Immunol.* 1981; 127: 1011-8; Beuvery e outros, *Infect. Immun.* 1983; 40:39-45. O primeiro método emprega PS parcialmente despolimerizado, que é ativado pela criação de grupos de aldeído
15 terminais através da oxidação de periodato (Método No. 1 na Tabela 2). Os aldeídos são então reagidos através da aminação redutiva combinada com os grupos de amino livre na proteína, principalmente lisina, na presença de cianoboroidreto de sódio. Observe Jennings e outros, *J. Immunol.* 1981. Neste
20 método, a ativação ocorre em um sítio específico no PS do grupo C.

O segundo método utiliza a reação de carbodiimida (Método No. 2 na Tabela 2) para covalentemente ligar os grupos carboxílicos no PS de peso molecular elevado aos grupos
25 de ϵ -amina de lisina na proteína portadora. Os sítios de ativação neste método são mais aleatórios, comparados com a ativação de periodato.

Os conjugados meningocócicos do grupo C preparados

por esses dois métodos têm sido avaliados em animais, Observe, Beuvery e outros, Dev. Biol. Stand. 1986; 65:197-204; e Beuvery e outros, J. Infect. 1983; 6:247-55. Os conjugados estimulam ambas respostas dependentes de célula T e independentes de célula T na imunização inicial. Observe, Beuvery e outros, J. Infect. 1983; 6: 247-55. Os estudos têm mostrado que o PS deve, entretanto, ser covalentemente ligado à proteína portadora para induzir uma resposta de anticorpo dependente de célula T.

10 Os primeiros conjugados meningocócicos do grupo A e grupo C a serem empregados em experiências clínicas foram preparados por Chiron Vaccines e foram reportados em 1992 (Método No. 3 na Tabela 2). Observe Costantino e outros, Vaccine 1992; 10: 691-8. O método de conjugação foi com base
15 na ativação do grupo terminal seletivo de pequenos oligossacarídeos produzidos por hidrólise de ácido moderada seguido por acoplamento a uma proteína através de um espaçador de hidrocarboneto. O mutante não tóxico de toxina de difteria, CRM₁₉₇, foi empregado como o portador de proteína. Para ativar os oligossacarídeos para conjugação, um grupo de amino
20 foi adicionado à extremidade do oligossacarídeo, e em seguida reagido com o diéster de N-hidroxisucinimida de ácido adípico para criar um éster ativo. Este éster ativo foi então covalentemente ligado aos grupos de ε-amino de lisina na
25 proteína₁₉₇, criando o conjugado.

Sumário da Invenção

Os métodos convencionais para a preparação das vacinas conjugadas de PS-proteína não usam o produto químico

de hidrazida na reação de conjugação de aminação redutiva, uma vez que a hidrazida na forma de ADH tem sido empregada na ativação de polissacarídeos. Esses métodos da técnica anterior utilizam os grupos de ϵ -amino de resíduos de lisina na proteína para reagir com os grupos funcionais nos PSs ativos, tal como grupos de aldeído (aminação redutiva) e grupos de carboxila. A eficiência da reação é baixa, tipicamente somente cerca de 20%. A reação também requer dois a três dias para a conjugação ser concluída, necessitando do uso de etapas de purificação para separar o conjugado do PS não reagido. Observe Guo e outros, "Protein-polysaccharide conjugation" em: Pollard e outros, *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 66: Meningococcal Vaccines: methods and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 2001, pág. 49-54. Existem várias explicações que têm sido propostas para as produções baixas observadas. Primeiro, o grupo de ϵ -amino de lisina ($pK_a = 10,5$) tem baixa reatividade nas condições de conjugação ($pH\ 6,5-7,4$). Observe Inman e outros, *Biochemistry* 1969; 8: 4074-4082. Segundamente, a maioria dos métodos de conjugação emprega toxóides como as proteínas portadoras. Os toxóides são derivados de uma toxina por destoxificação com formaldeído, que combina com os grupos de amino da toxina, deixando um número limitado de grupos de amino disponíveis para a conjugação. Terceiramente, a solubilidade reduzida da proteína ativada resultante e do conjugado de proteína-PS pode levar à precipitação.

As vacinas existentes com base em PSs são de uso limitado em crianças jovens e não fornecem proteção longa-

mente duradoura em adultos. Desse modo, uma necessidade existe para uma vacina conjugada de PS-proteína capaz de conceder proteção em longo prazo contra doenças em crianças e adultos em risco para, por exemplo, meningite bacteriana, influenza, tétano, e outras infecções bacterianas. Os conjugados de proteína-PS da modalidade preferida podem ser empregados para preparar as formulações de vacina capazes de conceder proteção em longo prazo a bebês, crianças e adultos.

10 Conseqüentemente, os métodos para a preparação das vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína em produções elevadas são desejáveis. Também desejáveis são os métodos onde a reação prossegue em uma taxa rápida, com produção reduzida de subprodutos indesejados, e com quantidades reduzidas de polissacarídeo e proteína não reagidos restantes no
15 final da reação.

Um procedimento aumentado para a produção de volumes comerciais (de 8 mL a 2.000 mL ou mais de produto final) é fornecido incluindo a otimização do equipamento de purificação. Durante a padronização da metodologia, o potencial imunogênico dos conjugados Men C foi comparado com CPS comum em camundongos através da indução de anticorpo total por ELISA, e sua atividade bactericida foi contra o filamento C de *N. meningitidis*. Nesta metodologia, os polissacarídeos A
20 (APS) e C (CPS) de *N. meningitidis* produzidos na Bio-Manguinhos, FioCruz, Rio de Janeiro, Brasil, foram covalentemente ligados ao toxóide de tétano (TT) (do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil), por aminação redutiva na presen-

ça de cianoboroidreto de sódio. O TT foi ativado com diidrocloreto de hidrazina em excesso, para introduzir grupos de hidrazina (-NH₂-NH₂) por reação de carbodiimida.

Conseqüentemente, em uma primeira modalidade, um método para a preparação de uma vacina conjugada é fornecido, o método compreendendo reagir um polissacarídeo com um agente de oxidação, por meio do qual uma solução de um polissacarídeo ativado por aldeído é obtida; reagindo uma proteína com dicloreto de hidrazina em um pH ácido, por meio do qual uma solução de uma proteína ativada por hidrazina é obtida; reagindo o polissacarídeo ativado por aldeído com a proteína ativada por hidrazina em um pH de cerca de 5 a cerca de 7 na presença de cianoboroidreto de sódio, por meio do qual um conjugado é obtido; e neutralizando os grupos de aldeído não reagidos com diidrazida de ácido adípico, por meio do qual uma vacina conjugada capaz de estimular uma resposta imune é obtida.

Em um aspecto da primeira modalidade, o agente de oxidação compreende NaIO₄.

Em um aspecto da primeira modalidade, a solução do polissacarídeo ativado por aldeído é permutada por tampão com um tampão HEPS.

Em um aspecto da primeira modalidade, a solução do polissacarídeo ativado por aldeído é permutada por tampão em um pH de cerca de 7 a cerca de 8.

Em um aspecto da primeira modalidade, a solução da proteína ativada por hidrazina é permutada por tampão com um tampão de Na₂CO₃.

Em um aspecto da primeira modalidade, a solução da proteína ativada por hidrazina é permutada por tampão em um pH de cerca de 10,0 a cerca de 11,0.

Em um aspecto da primeira modalidade, um pH da solução da proteína ativada por hidrazina é aumentado de cerca de 7,0 a cerca de 11 antes da solução de proteína ativada por hidrazina ser permutada por tampão em um pH de cerca de 10,0 a cerca de 11,0.

Em um aspecto da primeira modalidade, o polissacarídeo ativado por aldeído é reagido com a proteína ativada por hidrazina em uma relação de cerca de 1:1,6 a cerca de 1:5.

Em um aspecto da primeira modalidade, o método ainda compreende a etapa de diafiltrar a vacina conjugada, por meio da qual substancialmente todos os compostos não reagidos e polissacarídeos não conjugados são removidos, produzindo uma vacina conjugada purificada.

Em um aspecto da primeira modalidade, o método ainda compreende a etapa de concentrar a vacina conjugada purificada por ultrafiltração de fluxo tangencial, produzindo uma vacina conjugada purificada concentrada.

Em um aspecto da primeira modalidade, o método ainda compreende a etapa de adicionar a sacarose como um estabilizador à vacina conjugada purificada concentrada, produzindo uma vacina conjugada estabilizada.

Em um aspecto da primeira modalidade, o método ainda compreende a etapa de liofilização da vacina conjugada purificada concentrada, produzindo uma vacina conjugada seca.

Em um aspecto da primeira modalidade, o polissaca-

rídeo é selecionado do grupo consistindo em polissacarídeos meningocócicos, polissacarídeos de pneumococos, polissacarídeo tipo b de *Hemophilus influenzae*, polissacarídeo Vi de *salmonella typhi*, e polissacarídeos de Estreptococo do grupo

5 B.

Em um aspecto da primeira modalidade, a proteína é selecionada do grupo consistindo em toxóide de tétano, toxóide de difteria, CRM₁₉₇, e proteína meningocócica.

Breve Descrição dos Desenhos

10 Figura 1 fornece perfis de cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HPSEC) de polissacarídeos Men A oxidados e nativos, toxóide de tétano ativado e conjugado de Men A.

15 Figura 2 fornece IgG total (ELISA) de camundongos imunizados com 3 doses de três conjugados Men C diferentes (21 dias à parte).

Figura 3 fornece títulos bactericidas de camundongos imunizados com 3 doses de três conjugados Men C diferentes (21 dias à parte) (filamento alvo *N. meningitidis C*).

20 Descrição Detalhada da Modalidade Preferida

A seguinte descrição e os exemplos ilustram uma modalidade preferida da presente invenção em detalhes. Aqueles de experiência na técnica reconhecem que existem numerosas variações e modificações desta invenção que são abrangidas por seu escopo. Conseqüentemente, a descrição de uma modalidade preferida não deve ser suposta limitar o escopo da presente invenção.

25

Introdução

Os métodos convencionais para a síntese e preparação das vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína tipicamente empregam as reações de conjugação com eficiência 5 baixa (tipicamente cerca de 20%). Isto significa que até 80% do polissacarídeo ativado adicionado é perdido. Além disso, um processo cromatográfico para purificação dos conjugados de PS não conjugado é tipicamente requerido. Os métodos sintéticos das modalidades preferidas utilizam as propriedades 10 químicas, características de grupos de hidrazida em um reagente para reagir com os grupos de aldeído ou ésteres de cianato no outro reagente com uma produção de conjugado melhorada (tipicamente, tão elevada quanto 60%).

Quando a reação de conjugação prossegue com uma 15 eficiência de conjugação maior, a quantidade de polissacarídeo e proteína não conjugados restantes após a reação, pode ser suficientemente baixa a fim de tornar sua remoção desnecessária. Conseqüentemente, o processo de purificação do produto de conjugado pode ser simplificado para, por exem- 20 plo, uma etapa de diafiltração para remoção de subprodutos de moléculas pequenas. A reação de conjugação com base em hidrazida pode ser realizada para conclusão dentro de um ou dois dias em concentrações de reagente de cerca de 1 a cerca de 40 mg/mL em relações em mol de PS/ proteína de cerca de 25 1:5 a cerca de 5:1, preferivelmente de cerca de 1:2 a cerca de 1:1,6 ou 1:1, embora em certas modalidades relações maiores ou menores possam ser preferidas. A reação de conjugação é preferivelmente conduzida a temperaturas de cerca de 4°C a

cerca de 40°C, preferivelmente de cerca de 5, 10, 15 ou 20°C a cerca de 25, 30 ou 35°C, e em um pH de cerca de 6 a cerca de 8,5, preferivelmente de cerca de 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 ou 6,5 a cerca de 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 5 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3 ou 8,4, com condições ideais variando de acordo com o polissacarídeo. Conseqüentemente, a vacina conjugada pode ser preparada em custo reduzido quando uma reação de conjugação com base em hidrazida é empregada.

10 Para superar certas desvantagens dos métodos convencionais para sintetizar as vacinas conjugadas, um método para a conjugação de PSs às proteínas portadoras empregando produto químico de hidrazida na reação de conjugação de cianilação e aminação de redução é fornecido. Os grupos de hidrazida tendo a estrutura $-NH-NH_2$ são introduzidos nos grupos de carboxila dos resíduos de ácido aspártico e/ou ácido glutâmico de moléculas de proteína por reação de carbodiimida com hidrazina, ADH, carboidrazida, ou diidreto de sucinila. A proteína ativada é mantida solúvel em um pH de cerca 20 de 10 a cerca de 11,5, preferivelmente de cerca de 10,1, 10,2, 10,3, ou 10,4 a cerca de 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,0, 11,1, 11,2, 11,3, ou 11,4, e mais preferivelmente cerca de 10,5, com um tampão em uma concentração de cerca de 3 ou menos a cerca de 10 mM ou mais, preferivelmente de cerca de 4 25 ou 5 mM a cerca de 6, 7, 8 ou 9 mM, antes da conjugação. Os tampões adequados incluem porém não estão limitados a Na_2CO_3 , ácido 3-(cicloexilamino)-1-propanosulfônico (CAPS), e ácido sulfônico de (2-(N-cicloexilamino)etano (CHES). A

proteína ativada é então reagida com o polissacarídeo ativado contendo grupos ou de aldeído (aminação redutiva) ou de cianato (conjugação de cianilação) em um pH de cerca de 6 a cerca de 8,5, preferivelmente de cerca de 6,1, 6,2, 6,3, 6,4
5 ou 6,5 a cerca de 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0 na presença de um tampão em uma concentração de cerca de 100 mM ou menos a cerca de 200 mM, preferivelmente de cerca de 110, 120, 130, 140 ou 150 mM a cerca de 160, 170, 180 ou 190 mM. Os tampões adequados incluem, porém não estão limitados a piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfônico) de N-(2-hidroxietil) (HEPES), salina tamponada de fosfato (PBS), TES (EDTA, Tris-HCl, SDS), ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), e ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES).

15 Alternativamente, o PS pode ser funcionalizado com os grupos de hidrazida. O PS ativado pode ser conjugado, em pH 6,5-7,5 com um tampão forte, para proteínas ativadas contendo grupos de aldeído (aminação redutiva). A proteína é mantida solúvel em um pH de cerca de 10,5 com um tampão fraco até o ponto de conjugação. Por causa da reatividade mais elevada dos grupos de hidrazida (pKa= 2,6) comparados com o grupo de ϵ -amino de lisina (pKa= 10,5) em condições ácidas neutras/ moderadas, e por causa da solubilidade realçada do conjugado empregando proteína ativada mantida solúvel em
20
25 cerca de pH 10,5 antes da conjugação, a produção da reação de conjugação é grandemente aumentada.

Os conjugados preparados por esses métodos são imunogênicos em animais experimentais, como demonstrado nas

experiências em camundongos. Além disso, a reação de conjugação pode ser eficientemente realizada sem cianoboroidreto de sódio, por meio do qual evitando a introdução de íon de cianeto no produto conjugado. A reação pode ser conduzida
5 sob condições de pH neutro ou ácido moderado a temperatura ambiente ou a 4°C durante a noite quando oposta aos dias para os métodos de conjugação de aminaçãõ redutiva convencionais. Isto novamente garante a produção de vacina conjugada de produção elevada para polissacarídeos instáveis, tal como
10 aqueles de *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* tipo 19F e *Neisseria meningitidis* grupo A. Os métodos das modalidades preferidas podem ser empregados para produzir vacinas conjugadas menos caras, por meio das quais promovendo grandemente a saúde pública.

15 O Polissacarídeo

O termo "polissacarídeo" como empregado aqui, é um termo amplo, e é empregado em seu sentido ordinário, incluindo, sem limitação, o sacarídeo compreendendo uma pluralidade de unidades de repetição, incluindo, porém não limitado
20 aos polissacarídeos tendo 50 ou mais unidades de repetição, e oligossacarídeos tendo 50 ou menos unidades de repetição. Tipicamente, os polissacarídeos têm de cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou 95 unidades de repetição a cerca de 2.000 ou mais unidades de repetição, e preferivelmente de
25 cerca de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 unidades de repetição a cerca de 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 ou 1900 unidades de repetição. Os oligossacarídeos tipicamente abrangem de cerca

de 6, 7, 8, 9 ou 10 unidades de repetição, a cerca de 15, 20, 25, 30 ou 35 a cerca de 40 ou 45 unidades de repetição.

Os polissacarídeos adequados para uso nas modalidades preferidas incluem os polissacarídeos e oligossacarídeos de bactérias encapsuladas. Os polissacarídeos e oligossacarídeos podem ser de qualquer fonte, por exemplo, eles podem ser derivados de bactérias de ocorrência natural, bactérias geneticamente construídas, ou podem ser produzidos sinteticamente. Os polissacarídeos e oligossacarídeos podem ser submetidos a uma ou mais etapas de processamento antes da ativação, por exemplo, purificação, funcionalização, despolimerização empregando condições oxidativas moderadas, desacetilação, e outros. As etapas pós-processamento podem também ser empregadas, se desejado. Qualquer método adequado conhecido na técnica para sintetização, preparação e/ou purificação de oligossacarídeos e polissacarídeos adequados pode ser empregado.

Os polissacarídeos ou oligossacarídeos para uso nas modalidades preferidas incluem os polissacarídeos pneumocócicos de, por exemplo, sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F; polissacarídeos meningocócicos de sorotipos A, B, C, W135, e Y, fosfato de poliribosilribitol de polissacarídeo *Haemophilus influenzae* tipo b, polissacarídeos estreptocócicos do grupo B de sorotipos III e V e polissacarídeos *Salmonella typhi* Vi. Outros polissacarídeos de sorotipos estreptocócicos do grupo B e pneumocócicos, e sorogrupos meningocócicos são também adequados para uso aqui, uma vez

que são outros antígenos de polissacarídeo e oligossacarídeo independente de T, por exemplo, polissacarídeos e oligossacarídeos derivados de estreptococos do grupo A, estafilococo, enterococo, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Bacillus anthracis*. Ao mesmo tempo em que os oligossacarídeos e polissacarídeos bacterianos são particularmente preferidos, os lipopolissacarídeos e lipooligossacarídeos gram (-) bacterianos e seus derivados de polissacarídeos e oligossacarídeos, e oligossacarídeos e polissacarídeos virais podem também ser empregados.

Os polissacarídeos com fósforo da cadeia principal e/ou fósforo da cadeia lateral são adequados para uso nas modalidades preferidas. As reações de conjugação das modalidades preferidas são particularmente bem adequadas para uso com polissacarídeos tendo fósforo na cadeia principal. Tais polissacarídeos são sensíveis a fragmentação e degradação, para que a rapidez da reação de conjugação resulte em um conjugado de qualidade mais elevada devido ao tempo reduzido durante o qual a degradação pode ocorrer.

Após a conclusão de qualquer etapa de pré-processamento, o polissacarídeo ou oligossacarídeo é submetido a uma etapa de "ativação". O termo "ativação" se refere a um tratamento químico do polissacarídeo para fornecer os grupos químicos capazes de reagir com as proteínas. Em uma modalidade particularmente preferida, a ativação envolve a funcionalização do polissacarídeo ou oligossacarídeo com grupos de hidrazida que são reagidos com grupos de aldeído em uma proteína funcionalizada. Alternativamente, o polissa-

carídeo ou oligossacarídeo pode ser funcionalizado com grupos de aldeído, grupos de cetona, ou grupos de cianato que são reagidos com os grupos de hidrazida em uma proteína funcionalizada.

5 Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar o polissacarídeo ou oligossacarídeo com os grupos de hidrazida. Uma reação de funcionalização preferida é a aminação redutiva, onde o polissacarídeo ou oligossacarídeo é reagido com NaIO_4 em uma reação de ativação de periodato para produzir os grupos de aldeído, que são então reagidos com diidrazida de ácido adípico, seguido por redução subsequente com NaBH_4 .

10 Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar o polissacarídeo ou oligossacarídeo com grupos de aldeído. Certos polissacarídeos e oligossacarídeos possuem grupos de aldeído terminais que podem participar na reação de conjugação. Se o polissacarídeo ou oligossacarídeo é ativado com os grupos de aldeído, uma reação preferida envolve a reação com um agente de oxidação, tal como NaIO_4 . Os agentes de oxidação têm o potencial para fragmentar o polissacarídeo ou oligossacarídeo. A fragmentação indesejável pode ser evitada ou controlada através da seleção do agente de oxidação particular e da concentração do agente de oxidação empregado. Os grupos de cetona são também capazes de reagir com hidrazida, desse modo, o ativo de polissacarídeo ou oligossacarídeo com os grupos de cetona pode ser empregado em certas modalidades.

25 Uma solução de polissacarídeo ativada fortemente

tamponada (em pH de cerca de 6,5 a cerca de 8, com uma concentração de tampão elevada de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM) é preferivelmente empregada na reação de conjugação na forma de uma solução fortemente tamponada. Qualquer tampão adequado pode ser empregado, preferivelmente um tampão tal como piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfônico) de N-(2-hidroxi-etil).

A Proteína

O polissacarídeo ou oligossacarídeo ativado é acoplado a uma proteína para produzir uma vacina conjugada. As proteínas adequadas incluem as toxinas bacterianas que são portadores imunologicamente eficazes que se tornaram seguras por meios químicos ou genéticos para administração a um indivíduo. Os exemplos incluem as toxinas bacterianas inativas tal como toxóide de difteria, CRM₁₇₉, toxóide de tétano, toxóide de coqueluche, *E. coli* LT, *E. coli* ST, e exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. As proteínas de membrana externa bacterianas tal como, complexo de membrana externa c (OMPC), porinas, proteínas de ligação de transferrina, pneumólise, proteína de superfície pneumocócica A (PspA), proteína de adesina pneumocócica (PsaA), ou proteínas de superfície pneumocócica BVH-3 e BVH-11 podem também ser empregadas. Outras proteínas, tal como antígeno protetor (PA) de *Bacillus anthracis*, ovalbumina, hemocianina de lapa de buraco de fechadura (KLH), albumina de soro humano, albumina de soro bovino (BSA) e proteína purificada derivada de tuberculina (PPD) podem também ser empregadas. As proteínas são preferivelmente proteínas que sejam não tóxicas e não reatogênicas

e obteníveis em pureza e quantidade suficientes, as quais sejam tratáveis pelos métodos de conjugação das modalidades preferidas. Por exemplo, a toxina de difteria pode ser purificada de culturas de *Corynebacteria diphtheriae* e quimicamente detoxificada empregando formaldeído para produzir uma

5 proteína adequada.

Os fragmentos dos toxóides ou toxinas nativas, que contêm pelo menos um epítopo de célula T, são também úteis, uma vez que são complexos de proteína de membrana externa,

10 bem como certos análogos, fragmentos e/ou fragmentos análogos das várias proteínas listadas acima. As proteínas podem ser obtidas de fontes naturais, podem ser produzidas por tecnologia recombinante, ou por métodos sintéticos como são conhecidos na técnica. Os análogos podem ser obtidos por vá-

15 rios meios, por exemplo, certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos em uma proteína sem perda apreciável da capacidade de ligação interativa com estruturas tal como, por exemplo, regiões de ligação de antígeno de anticorpos ou sítios de ligação em moléculas de substratos.

20 Outras proteínas podem também ser empregadas, tal como aquelas contendo grupos de ácido aspártico ou ácido glutâmico expostos na superfície.

Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar a proteína com os grupos de hidrazina.

25 Preferivelmente, os grupos de hidrazina são introduzidos nas proteínas através dos grupos de carboxila de resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico na proteína empregando uma reação de carbodiimida, por exemplo, por reação

com hidrazina, carboidrazida, diidrazida de succinila, diidrazida de ácido adípico ou qualquer outra diidrazida na presença de EDC. O EDC é empregado como um catalisador para ativar e modificar o reagente de proteína com hidrazina ou com a diidrazida. Qualquer carbodiimida solúvel em água incluindo EDC pode ser empregado como um catalisador. As proteínas catalisadas por EDC geralmente têm uma tendência a polimerizar e precipitar, e desse modo não são geralmente preferidas para preparação de conjugados envolvidos com a proteína. Observe Schneerson e outros, *Infect. Immun.* 1986, 52: 519-528; Shafter e outros, *Vaccine* 2000; 18(13): 1273-1281; e Inman e outros, *Biochemistry* 1969; 8-4074-4082. A agregação e precipitação da proteína ativada dependem, em parte, do seu ambiente de pH. Conseqüentemente, a tendência de polimerizar e de precipitar pode ser controlada mantendo-se tais proteínas modificadas por hidrazida solúveis em uma solução tamponada. Permutando-se por tampão a mistura de reação, a fim de manter a proteína ativada em um pH de cerca de 10,5, a proteína ativada permanece solúvel e estável para conjugação. Qualquer tampão adequado pode ser empregado. Preferivelmente, um tampão fraco tal como Na_2CO_3 em uma concentração baixa de cerca de 3 mM a cerca de 10 mM é empregado.

A proteína modificada por hidrazida tamponada pode então ser empregada na preparação de conjugados de proteína-polissacarídeo sem precipitação quando adicionada ao polissacarídeo ativado em um pH de cerca de 6 a 8,5, preferivelmente de cerca de 6,5 a cerca de 8. Qualquer reação de funcionalização adequada pode ser empregada para ativar a pro-

teína com os grupos de aldeído, Preferivelmente, a proteína é reagida com 1-amino-2, 3-propanodiol na presença de EDC. Os açúcares de amino como glicosamina, galactosamina, e outros, podem ser empregados no lugar de 1-amino-2,3-propanodiol. Nesta reação, EDC é também empregado como um catalisador para ativar e modificar o reagente de proteína com o aminodiol através dos grupos de carboxila de resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico da proteína.

Preparação de Conjugados por Aminoação Redutiva

10 Os conjugados podem ser preparados através da reação dos grupos de aldeído e hidrazida (aminoação redutiva). A reação de conjugação de aminoação redutiva pode ser empregada para conjugar um reagente modificado por hidrazida (proteína ou polissacarídeo) ao outro componente contendo os grupos de

15 aldeído.

Na aminoação redutiva convencional, a reação entre os grupos de amino e aldeído é reversível e desfavorável, tal que o cianoboroidreto de sódio seja necessário para facilitar a conjugação convertendo-se a ligação dupla C=N para uma ligação única C-N para tornar o evento de aminoação redutiva total irreversível. Em contraste, a reação de conjugação de aminoação redutiva das modalidades preferidas prossegue sem o auxílio do cianoboroidreto de sódio por causa da eficiência elevada da reação de hidrazida-aldeído. No final

20 da reação de conjugação de aminoação redutiva, o boroidreto de sódio ou outro reagente adequado é empregado para reduzir a ligação dupla C=N para uma ligação única C-N, bem como para reduzir qualquer grupo de aldeído residual para grupos de

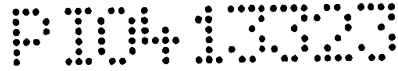
25

álcool. A reação de conjugação de amina redutiva das modalidades preferidas evita a contaminação do conjugado resultante com cianeto, um subproduto de cianoboroidreto de sódio.

5 Para reduzir a precipitação de proteína ativada durante a reação de conjugação, a proteína ativada está preferivelmente na forma de uma solução fracamente tamponada com uma concentração de tampão baixa de cerca de 3 mM a cerca de 10 mM que é adicionado a uma solução de polissacarídeo
10 ativada fortemente tamponada (em pH de cerca de 6,5 a cerca de 7,5, com uma concentração de tampão elevada de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM). Preferivelmente, o pH da solução de proteína ativada é tamponado em cerca de 10 pH a cerca de 11,5 pH, mais preferivelmente a cerca de 10,5 pH. A solução
15 de polissacarídeo ativada é preferivelmente fortemente tamponada de cerca de 6 pH a cerca de 8 pH, mais preferivelmente de cerca de 6,5 pH a cerca de 7,5 pH. A reação de amina-
20 ção redutiva de aldeído por hidrazida prossegue em uma taxa rápida, e o efeito de precipitação de um pH menor do que 10,5 (por exemplo, um pH tão baixo quanto de cerca de 8,5 a cerca de 9,5) em proteína ativada, é superado pelas propriedades moleculares da reação dos polissacarídeos ativados.

Os Conjugados

25 Ambos reagentes contêm múltiplos grupos reativos por molécula. Uma molécula de polissacarídeo ativado pode reagir e formar mais do que uma ligação para mais do que uma molécula de proteína ativada. Igualmente, uma molécula de proteína ativada pode reagir com e formar mais do que uma



39

ligação a mais do que uma molécula de polissacarídeo ativa-
do. Portanto, o produto conjugado é uma mistura de várias
estruturas de treliça tipo matriz reticuladas. Por exemplo,
uma ligação única pode estar presente, ou 2, 3, 4, 5, 6, 7,
5 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,
23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 ou mais ligações podem es-
tar presentes. O número médio de ligações entre um polissa-
carídeo e uma proteína pode ser ajustado, quando preferido.
O número médio preferido de ligações pode depender do tipo
10 de polissacarídeo, do tipo de proteína, do método de conju-
gação, das condições de reação, e outros. Geralmente, uma
média de 1 ligação a cerca de 2, 3, 4 ou 5 ligações está
presente, a fim de evitar a interferência com a capacidade
da proteína de estimular o sistema imune por super-
15 conjugação, e desse modo não causar alterações na estrutura
de polissacarídeo. Entretanto, em certas modalidades, mais
do que 5 ligações podem ser toleradas ou mesmo desejáveis.

Após a conjugação, o conjugado pode ser purificado
por qualquer método adequado. A purificação é empregada para
20 remover o polissacarídeo não reagido, proteína, ou pequenos
subprodutos da reação de molécula. Os métodos de purificação
incluem a ultrafiltração, cromatografia de exclusão de tama-
nho, centrifugação por gradiente de densidade, cromatografia
de interação hidrofóbica, fracionamento de sulfato de amô-
25 nio, e outros, como são conhecidos na técnica. Como descrito
acima, as reações de conjugação das modalidades preferidas
prosseguem com produção mais elevada, e geram menos subpro-
dutos de reação de molécula pequena indesejáveis. Conseqüen-

temente, nenhuma purificação pode ser necessária, ou somente um grau menor de purificação pode ser desejável. O conjugado pode ser concentrado ou diluído, ou processado em qualquer forma adequada para uso nas composições farmacêuticas, como
5 desejado.

Métodos de Tratamento

Os conjugados preparados de acordo com a modalidade preferida são administrados a um indivíduo em uma dose imunologicamente eficaz em uma forma adequada para tratar
10 e/ou prevenir doenças infecciosas. O termo "indivíduo" como empregado aqui, se refere a animais, tal como mamíferos. Por exemplo, os mamíferos contemplados incluem humanos, primatas, cães, gatos, ovelhas, gado vacum, cabras, porcos, cavalos, camundongos, coelhos, cobaias, e outros. Os termos,
15 "indivíduo", "paciente", e "hospedeiro" são empregados alternadamente. Como empregado aqui, uma dose "imunologicamente eficaz" da vacina conjugada é uma dose que seja adequada para eliciar uma resposta imune. A dosagem particular depende da idade, peso e condição médica do indivíduo a ser tra-
20 tado, bem como do método de administração. As doses adequadas podem ser facilmente determinadas por aqueles versados na técnica.

As composições farmacêuticas compreendendo as vacinas conjugadas das modalidades preferidas podem oferecer
25 vantagens sobre as vacinas convencionais, incluindo a imunogenicidade realçada de antígenos fracamente imunogênicos, redução do potencial na quantidade do antígeno empregado, imunizações de reforço menos freqüentes, eficácia melhorada,

estimulação preferencial de imunidade, ou alvejamento potencial de respostas imunes. As vacinas podem ser administradas a um indivíduo por uma variedade de rotinas, como descrito abaixo, incluindo porém não limitado a rotinas parenterais 5 (por exemplo, por injeção intracisternal e técnicas de infusão), intradérmicas, transmembranais, transdermais (incluindo tópico), intramusculares, intraperitoneais, intravenosas, intra-arteriais, intralesionais, subcutâneas, orais, e intranasais (por exemplo, inalação) de administração. A vacina 10 conjugada pode ser administrada por injeção de bolo ou por infusão contínua, bem como por administração localizada, por exemplo, em um sítio da doença ou lesão. A vacina conjugada pode ser opcionalmente administrada em um veículo farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitável.

15 O termo "vacina" como empregado aqui, é um termo amplo e é empregado em seu sentido ordinário, incluindo, sem limitação, conjugados das modalidades preferidas ou outros antígenos formulados com adjuvantes, diluentes, excipientes, portadores, e outras substâncias farmacêuticamente aceitáveis. 20 O termo "farmacêuticamente aceitável" é empregado para referir-se a um material não tóxico que seja compatível com um sistema biológico tal como célula, cultura de célula, tecido, ou organismo.

Os protocolos de imunização para uso com os conjugados das modalidades preferidas fornecem composições e métodos 25 para a prevenção ou tratamento de uma doença, distúrbio e/ou infecção em um indivíduo. O termo "tratamento" como empregado aqui, é um termo amplo e é empregado em seu senti-

do ordinário, incluindo sem limitação, tratamento de melhoria, curativo, preventivo, profilático e/ou paliativo.

As composições de vacina são preferivelmente estéreis e contêm uma quantidade ou terapêuticamente ou profilaticamente eficaz do conjugado em uma unidade de peso ou volume adequada para a administração a um indivíduo. O termo "portador farmacêuticamente aceitável" como empregado aqui significa um ou mais substâncias de encapsulação, diluentes ou cargas líquidas ou sólidas compatíveis que são adequadas para administração em um indivíduo. O termo "portador" significa um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o ingrediente ativo é combinado para facilitar a aplicação. As características do portador dependem da rotina de administração. Os portadores fisiologicamente e farmacêuticamente aceitáveis incluem os diluentes, cargas, sais, tampões, estabilizadores, solubilizadores, e outros materiais que sejam bem conhecidos na técnica.

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

A formulação das vacinas conjugadas das modalidades preferidas nas composições farmacêuticas pode ser concluída empregando os métodos conhecidos na técnica. As composições de vacina podem também conter um ou mais adjuvantes. Os adjuvantes adequados incluem, por exemplo, adjuvantes de alumínio, tal como hidróxido de alumínio ou fosfato

de alumínio, adjuvante de Freund, BAY, DC-chol, pcpp, lipídeo A de monofosforila, CpG, QS-21, toxina de cólera e peptídeo de metionila de formila. Observe, por exemplo, Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, 1995 (M.F. Powell and M, J. Newman, eds., Plenum Press, N.Y.).

A dosagem da vacina conjugada, a ser administrada a um indivíduo e o regime de administração podem ser determinados de acordo com as técnicas padrões bem conhecidas por aqueles de experiência ordinária nas técnicas farmacêuticas e veterinárias, levando em consideração tais fatores como o uso pretendido, antígeno particular, o adjuvante (se presente), a idade, sexo, peso, espécie, condição geral, tratamentos e/ou doenças anteriores, e a rotina de administração. As doses preliminares podem ser determinadas de acordo com os testes com animais, e o escalamento das dosagens para a administração a humanos é realizado de acordo com as práticas aceitas pela técnica tal como experiências com dosagem padrão. Por exemplo, a dose terapêuticamente eficaz pode ser inicialmente estimada de teste de nível de anticorpo de soro. A dosagem depende da atividade específica do conjugado e pode ser facilmente determinada pela experimentação de rotina.

Na prática dos protocolos de imunização para o tratamento e/ou prevenção de doenças específicas, uma quantidade terapêuticamente eficaz de conjugado é administrada a um indivíduo. Como empregado aqui, o termo "quantidade eficaz" significa a quantidade total do agente terapêutico (por exemplo, conjugado) ou outro componente ativo que seja suficiente para mostrar um benefício significativo ao indivíduo,

AA

tal como, resposta imune realçada, tratamento, cicatrização, prevenção ou melhora da condição médica relevante (doença, infecção, ou outros), ou um aumento na taxa de tratamento, cicatrização, prevenção ou melhora de tais condições. Quando

5 "quantidade eficaz" é aplicada a um agente terapêutico individual administrado sozinho, o termo se refere àquele agente terapêutico somente. Quando aplicado a uma combinação, o termo se refere às quantidades combinadas dos ingredientes que resulta no efeito terapêutico, quer administrado em com-

10 binação, serialmente ou simultaneamente. Como empregada aqui, a frase "administrar uma quantidade eficaz" de um agente terapêutico significa que o indivíduo é tratado com o referido agente(s) terapêutico em uma quantidade e durante um tempo suficiente para induzir uma melhora, e preferivelmente

15 uma melhora prolongada, em pelo menos um indicador que reflète a gravidade da doença, infecção ou distúrbio.

Uma melhora é considerada "prolongada" se o paciente exibe a melhora em pelo menos duas ocasiões separadas por um período de tempo. O grau de melhora pode ser determi-

20 nado com base, por exemplo, nos dados imunológicos, ou nos sinais ou sintomas da doença, infecção, ou distúrbio. Vários indicadores que refletem a extensão da doença do paciente podem ser avaliados para determinar se a quantidade e tempo do tratamento são suficientes. O valor de referência para o

25 indicador ou indicadores de escolha pode ser estabelecido com base no exame do paciente antes da administração da primeira dose do agente terapêutico, ou com base nos valores estatísticos gerados de uma população de pacientes saudá-

veis. Se o agente terapêutico é administrado para tratar sintomas agudos, a primeira dose é administrada assim que praticamente possível. A melhora é induzida por administração de agentes terapêuticos até que indivíduo manifeste uma
5 melhora no valor de referência para os indicadores ou indicador de escolha. No tratamento de condições crônicas, este grau de melhora é obtido repetidamente administrando-se os agentes terapêuticos durante um período de tempo, por exemplo, durante um, dois ou três meses ou mais, ou indefinidamente. Uma dose única pode ser suficiente para tratar ou
10 prevenir certas condições. O tratamento pode ser continuado indefinidamente no mesmo nível ou em uma frequência ou dose reduzida, independente da condição do paciente, se desejado. Uma vez que o tratamento tenha sido reduzido ou descontinuado,
15 mais tarde pode ser retomado no nível original se os sintomas reaparecerem.

Geralmente, a quantidade de conjugado que fornece uma dose eficaz ou dose terapeuticamente eficaz para vacinação contra infecção bacteriana é de cerca de 1 μg ou menos a
20 cerca de 100 μg ou mais, preferivelmente de cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 μg a cerca de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, ou 95 μg por kg de peso corpóreo. Uma dosagem eficaz pode requerer menos anti-corpo se o tempo pós-infecção passado for menor, uma vez que
25 há menos tempo para as bactérias proliferarem. Uma dosagem eficaz pode também depender da carga bactericida no tempo da diagnose. Injeções múltiplas administradas durante um período de dias, podem ser consideradas para uso terapêutico.

As vacinas conjugadas podem ser administradas como uma dose única ou em uma série incluindo um ou mais reforços. Por exemplo, um bebê ou criança pode receber uma dose única precocemente na vida, em seguida ser administrado com
5 uma dose de reforço até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais anos mais tarde. A dose de reforço gera anticorpos de células B iniciadas, isto é, uma resposta anestésica. Isto é, a vacina conjugada elicia uma resposta de anticorpo funcional primária elevada em bebês e crianças, e capaz de eliciar uma resposta anestésica seguinte a uma administração de
10 reforço, demonstrando que a resposta imune protetora eliciada pela vacina conjugada é prolongada.

As vacinas conjugadas podem ser formuladas em preparações líquidas para, por exemplo, administração nasal,
15 anal, retal, bucal, vaginal, peroral, intragástrica, mucosal, perlingual, alveolar, gingival, olfatória, ou da mucosa respiratória. As vacinas conjugadas podem também ser formuladas para administração parenteral, subcutânea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa, administração
20 injetável, liberação prolongada de implantes, ou administração por colírio. As formas adequadas para tais administrações incluem emulsões e suspensões estéreis. Tais vacinas conjugadas podem também ser liofilizada. As vacinas conjugadas podem conter substâncias auxiliares tal como a-
25 gentes umectantes e emulsificantes, agentes de tamponamento de pH, aditivos de realce de viscosidade ou gelificação, preservativos, agentes aromatizantes, colorantes, e outros, dependendo da rotina de administração e da preparação dese-

jada. Os textos padrões, tal como "Remington: The Science and Practice of Pharmacy ", Lippincott Willians & Wilkins; 20ª edição (1 de junho, de 2003) e "Remington's Pharmaceutic Science", Mack Pub. Co.; 18ª e 19ª edições (dezembro, de 5 1985, e junho de, 1990, respectivamente), incorporadas aqui por referencia em sua totalidade, podem ser consultados para preparar as preparações adequadas, sem experimentação indevida. Tais preparações podem incluir agentes de complexação, íons de metal, compostos poliméricos tal como ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogéis, dextrana, e outros, 10 lipossomas, microemulsões, micelas, vesículas unilamelares e multilamelares, esferoblastos e espectros de eritrócitos. Os lipídeos adequados para a formulação lipossômica incluem, sem limitação, monoglicerídeos, diglicerídeos, sulfatídeos, 15 lisolecitina, fosfolipídeo, saponina, ácidos biliares, e outros. A presença de tais componentes adicionais pode influenciar o estado físico, solubilidade, estabilidade taxa de liberação *in vivo*, e taxa de depuração *in vivo*, e são desse modo escolhidos de acordo com a aplicação pretendida, tal 20 que as características do portador sejam adaptadas para a rotina selecionada de administração.

As vacinas conjugadas são preferivelmente fornecidas como suspensões líquidas ou como produtos liofilizados. As preparações líquidas adequadas incluem, por exemplo, 25 luções aquosas isotônicas, suspensões, emulsões, ou composições viscosas que são tamponadas em um pH selecionado. As preparações transdérmicas incluem loções, géis, pulverizadores, unguentos, ou outras técnicas adequadas. Se a adminis-

tração nasal ou respiratória (mucosal) é desejada (por exemplo, insuflação ou inalação aerossol), as composições podem estar em uma forma e distribuídas por um distribuidor de pulverização por pressão, distribuidor de bomba, distribuidor aerossol. Os aerossóis são geralmente sob pressão através de um meio de hidrocarboneto. Os distribuidores de bomba podem preferivelmente distribuir uma dose medida ou uma dose tendo um tamanho de partícula particular, como descrito abaixo.

10 Quando na forma de solução, suspensões e géis, as formulações do conjugado podem tipicamente conter uma quantidade maior de água (preferivelmente água purificada) além do ingrediente ativo. Quantidades menores de outros ingredientes, tal como ajustadores de pH, emulsificantes, agentes dispersantes, agentes de tamponamento, preservativos, agentes umectantes, agentes de gelificação, corantes e outros, podem também estar presente.

As composições são preferivelmente isotônicas com o sangue ou outro fluido corpóreo do recipiente. A isotonicidade das composições pode ser alcançada empregando tartrato de sódio, propileno glicol ou outros solutos inorgânicos ou orgânicos. O cloreto de sódio é particularmente preferido. Os agentes de tamponamento podem ser empregados, tal como ácido acético e sais, ácido cítrico e sais, ácido bórico e sais, e ácido fosfórico e sais. Os veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, óleos fixados ou de Ringer lactados. Os veículos intravenosos incluem reabastecedores de

nutriente e fluido, reabastecedores de eletrólito (tal como aqueles com base em dextrose de Ringer), e outros.

A viscosidade das composições pode ser mantida no nível selecionado empregando um agente espessante farmacologicamente aceitável. A metilcelulose é preferida por que é facilmente e economicamente disponível e é fácil de se trabalhar. Outros agentes espessantes adequados incluem, por exemplo, goma xantam, carboximetil celulose, hidroxipropil celulose, carbômero, e outros. A concentração preferida do espessante pode depender do agente selecionado. O ponto importante é empregar uma quantidade que possa obter a viscosidade selecionada. As composições viscosas são normalmente preparadas de soluções pela adição de tais agentes espessantes.

Um preservativo farmacologicamente aceitável pode ser empregado para aumentar a vida de prateleira das composições. O álcool benzílico pode ser adequado, embora uma variedade de preservativos incluindo, por exemplo, parabenos, timerosal, clorobutanol, ou cloreto de benzalcônio podem ser empregados. Uma concentração adequada do preservativo pode ser de 0,02% a 2% com base no peso total embora possa haver variação apreciável dependendo do agente selecionado.

A liberação pulmonar do conjugado pode também ser empregada. O conjugado é liberado aos pulmões de um mamífero ao mesmo tempo em que inalando e atravessa através do revestimento epitelial do pulmão para a corrente sanguínea. Uma ampla faixa de dispositivos mecânicos designados para liberação pulmonar de produtos terapêuticos pode ser empregada,

incluindo porém não limitado a nebulizadores, inaladores de dose medida, e inaladores de pó, todos dos quais são familiares àqueles versados na técnica. Esses dispositivos empregam formulações adequadas para a distribuição do conjugado.

5 Tipicamente, cada formulação é específica para o tipo de dispositivo empregado e pode envolver o uso de um material propelente, além dos diluentes, adjuvantes e/ou portadores úteis na terapia.

10 O conjugado é vantajosamente preparado para liberação pulmonar na forma particulada com um tamanho de partícula médio de 0,1 μm ou menos a 10 μm ou mais, mais preferivelmente de cerca de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, ou 0,9 μm a cerca de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, ou 9,5 μm para 15 liberação pulmonar. Os portadores farmacologicamente aceitáveis para liberação pulmonar do conjugado incluem carboidratos tal como trealose, manitol, xilitol, sacarose, lactose e sorbitol. Outros ingredientes nas formulações podem incluir DPPC, DOPE, DSPC e DOPC. Os tensoativos naturais ou sintéticos 20 podem ser empregados incluindo polietileno glicol e dextranas, tal como ciclodextranas. Os sais biliares e outros realçadores relacionados, bem como celuloses e derivados de celulose, e aminoácidos podem ser empregados. Os lipossomas, microcápsulas, microsferas, complexos de inclusão e outros 25 tipos de portadores podem também ser empregado.

As formulações adequadas para uso com um nebulizador, ou a jato ou ultrassônico, tipicamente compreendem o conjugado dissolvido ou suspenso em água em uma concentração

de cerca de 0,01 ou menos a 100 mg ou mais de conjugado por mL de solução, preferivelmente de cerca de 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mg a cerca de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 82, 85 ou 90 mg por mL de solução. A formulação pode também incluir um tampão e um açúcar simples (por exemplo, para estabilização da proteína e regulação da pressão osmótica). A formulação de nebulizador pode também conter um tensoativo, para reduzir ou prevenir a agregação induzida na superfície do conjugado, causada por atomização da solução na formação do aerossol.

As formulações para uso com um dispositivo de inalador de dose medida geralmente compreendem um pó finamente dividido contendo o composto inventivo suspenso em um propelente com a ajuda de um tensoativo. O propelente pode incluir propelentes convencionais, tal como clorofluorocarboneto, um hidroclorofluorocarboneto, hidrofluorocarboneto, e hidrocarboneto, tal como triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, e 1,1,1,2-tetrafluoroetano, e combinações destes. Os tensoativos adequados incluem trio- leato de sorbitan, lecitina de soja, e ácido oléico.

As formulações para a distribuição de um dispositivo inalador de pó tipicamente compreendem um pó seco finamente dividido contendo o conjugado, opcionalmente incluindo um agente de volume, tal como lactose, sorbitol, sacarose, manitol, trealose, ou xilitol em uma quantidade que facilita a dispersão do pó do dispositivo, tipicamente de cerca de 1% em peso ou menos a 99% em peso ou mais da formulação, preferivelmente de cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 745 ou

50% em peso a cerca de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, ou 90% em peso da formulação.

Quando o conjugado pe administrado por injeção intravenosa, cutânea, subcutânea ou outra injeção, a vacina conjugada está preferivelmente na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável, livre de pirogênio. A preparação de soluções parenteralmente aceitáveis, com pH, isotonicidade, estabilidade adequados e outros, está dentro da capacidade da técnica. Uma composição farmacêutica preferida para injeção preferivelmente contém um veículo isotônico tal como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Dextrose, Injeção de Dextrose e Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer Lactada, ou outros veículos como são conhecidos na técnica. As composições farmacêuticas podem também conter estabilizadores, preservativos, tampões, antioxidantes, ou outros aditivos conhecidos por aqueles de experiência na técnica.

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

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

Os conjugados de modalidades preferidas, ou os métodos de conjugação das modalidades preferidas, podem ser

úteis na preparação de vacinas para o tratamento de uma variedade de infecções bacterianas, incluindo infecções por *Helicobacter puloris*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophilia*, *Mycobacteris sps.* (por exemplo, *M. tuberculosis*,
 5 *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* do grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do grupo B), *Streptococcus* (grupos de *viridans*),
 10 *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (*anaerobic sps.*), *Streptococcus pneumoniae*, *pathogenic Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringers*,
 15 *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteróides sp.*, *Fusobacterium nuclealum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, e *Actinomyces israeli*.

20 Certos métodos das modalidades preferidas podem também ser de uso na preparação de vacinas para o tratamento ou vacinação de indivíduos contra câncer, tal como mamíferos, sarcomas e carcinomas, tal como fibrossarcoma, mixosarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico,
 25 cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfagiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma de cólon, câncer pancreático, câncer da mama, câncer ovariano,

câncer da próstata, carcinoma da célula escamosa, carcinoma da célula basal, adenocarcinoma, carcinoma da glândula sudorípara, carcinoma da glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma ductal da bile, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilm, câncer cervical, tumor testicular, carcinoma do pulmão, carcinoma microcelular do pulmão, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringeoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroplastoma, retinoblastoma; leucemias, tal como leucemia linfocítica aguda e leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, e eritroleucemia); leucemia crônica (leucemia mielocítica crônica (granulocítica) e leucemia linfocítica crônica); e policitemia Vera, linfoma (doença de Hodgkin e doença de não Hodgkin), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, e doença de cadeia pesada, distúrbios linfoproliferativos incluindo síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), leucemia linfoblástica crônica, leucemia de células pilosas, leucemia linfática crônica, linfoma da célula T periférica, linfoma pequeno, linfoma da célula manto, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma da célula T de vírus positivo Epstein-Barr, linfoma histiocítico, doença de Hodgkin, linfoma agressivo difuso, leucemias linfáticas agudas, doença linfoproliferativa gama T, linfoma de célula B cutâneo, linfoma de célula T cutâneo

(isto é, *mycosis fungoides*) e síndrome de Szary.

Os conjugados podem ser administrados em combinação com várias vacinas ou atualmente sendo empregadas ou em desenvolvimento, quer pretendida para indivíduos humanos e não humanos. Os exemplos de vacinas para indivíduos humanos, e direcionadas para doenças infecciosas incluem a vacina de toxóide tétano e difteria combinada; vacina de célula total de coqueluche; a vacina de influenza inativa; a vacina pneumocócica 23-valente; a vacina de sarampo viva; a vacina de cachumba viva; vacina de rubéola viva; vacina de tuberculose Bacille Calmette-Guerin (BCG); vacina de hepatite A; vacina de hepatite B; vacina de hepatite C; vacina de raiva; (por exemplo, vacina da célula diplóide humana); vacina da pólio inativa; vacina de polissacarídeo meningocócico; vacina meningocócica quadrivalente; vacina do vírus vivo da febre amarela; vacina da célula total morta de tifóide; vacina do cólera; vacina do vírus morto de encefalite B japonesa; vacina do adenovírus; vacina do citomagelovírus; vacina do rotavírus; vacina da varicela; vacina do antraz; vacina da varíola; e outras vacinas experimentais e comercialmente disponíveis.

Os conjugados podem ser fornecidos por um médico administrante ou outro profissional dos cuidados com a saúde na forma de um *kit*. O *kit* pe uma embalagem que aloja um recipiente que contem a vacina conjugada e as instruções para a administração da vacina conjugada a um indivíduo. O *kit* pode opcionalmente também conter um ou mais outros agentes terapêuticos. O *kit* pode opcionalmente conter uma ou mais

ferramentas de diagnóstico e instruções para uso, Por exemplo, um coquetel de vacina contendo duas ou mais vacinas pode ser incluído, ou composições farmacêuticas separadas contendo vacinas diferentes ou agentes terapêuticos. O *kit* pode também conter doses separadas da vacina conjugada para administração serial ou seqüencial. O *kit* pode conter dispositivos de liberação adequada, por exemplo, seringas, dispositivos de inalação, e outros, junto com as instruções para a administração dos agentes terapêuticos. O *kit* opcionalmente pode conter instruções para armazenamento, reconstituição (se aplicável), e administração de qualquer ou todos os agentes terapêuticos incluídos. Os *kits* podem incluir uma pluralidade de recipientes refletindo o número de administrações a ser dada a um indivíduo. Se o *kit* contiver um primeiro e segundo recipiente, então uma pluralidade desses pode estar presente.

Experiências

Materiais

O toxóide tétano (TT) foi fornecido pelo Instituto Butantam, São Paulo, SP, Brasil. Ele foi produzido e purificado de acordo com as especificações requeridas para a aplicação de vacina DTP (World Health Organization, 1990, Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines, WHO Technical report series No. 800, Geneva, World Health Organization). A pureza antigênica de TT é mais elevada do que 1.500 Lf/mg de proteína Nitrogen (World Health Organization Expert Committee on Biological standardization, 2001. Recommendations for the production & control of menin-

gococcal group C conjugate vaccines (Draft), Gêneva, 26-30 Novembro). O teor da proteína foi avaliado pelo Método de Bradford. Observe Bradford, M.M. 1976, Anal. Biochem., 72:248.

5 Os polissacarídeos dos grupos A e B meningocócicos (PS A Mn e PS C Mn, respectivamente) foram fornecidos por Bio-Manguinhos, Fundação Olwaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Eles foram obtidos por cultivo de filamentos vacinais 1951 e 2135 de *N. meningitidis*, respectivamente, em
10 meio Frantz e purificados como descrito anteriormente. Resumidamente, as culturas foram colhidas após a morte dos microorganismos por aquecimento a 56°C durante 30 minutos, após o que os APS e CPS foram parcialmente purificados por precipitação com brometo de trimetilamônio de hexadecila
15 (Cetavlon). Os polissacarídeos capsulares precipitados por cetavlon foram purificados por extração de fenol seguido por eliminação de endotoxina por centrifugação diferencial (Gotschlich e outros, J. Exp. Med., 129:1349-1365; World Health Organization, 1976, Requeriments for meningococcal
20 polysaccharide vaccine. N^{os}. de série do relatório técnico 594, 50-75, Geneva; World Health Organization, 1981, Requeriments for meningococcal polysaccharide vaccine. N^{os}. de série do relatório técnico 658, Geneva; World Health Organization 29).

25 O teor de açúcar de CPS e APS foi medidos pelo método de Svennerholm e cromatografia de permuta de íon de alto desempenho com detecção amperométrica pulsionada (HPAEC-PAD), respectivamente (Svennerholm, L. 1957, Biochim. Bio-

phys. Acta, 24:604-611; Ricci e outros, 2001, Vaccine, 19:1989-1997). As identidades, estruturas e purezas dos polissacarídeos foram avaliadas por Ressonância Magnética Nuclear de Próton (NMR) (Jones e outros, 1996, Dev. Biol. Stand. Basel Karger, 87:143-151; Jodar e outros, 2004, Vaccine, 22: 1047-1053).

Métodos

Ativação de Proteína

O TT foi ativado com diidrocloridrato de hidrazina em 50 x de excesso para introduzir os grupos de hidrazina através da metodologia de carbodiimida em temperatura ambiente e condições ácidas. O toxóide de tétano ativado por hidrazina (TTH) obtido foi purificado por diafiltração contra 0,02 M de PBS, pH 7,4 (~12 volumes) e concentrado empregando uma Ultrafiltração de Fluxo Tangencial (Minisette System - Pall BioPharmaceuticals) e cassetes de membrana tipo Omega (Screen Channel - Polietersulfona Hidrofílico) (Handbook, 1999). As condições de purificação foram padronizadas para processar pelo menos 5 litros de solução.

Conjugação

O TT ativado por hidrazina (TTH) foi reagido com polissacarídeos ativados por aldeído em relação de 1:1,6 a 1:5 e faixa de concentração de 1-40mg/mL durante a noite, pH 5,0-7,0, 22-45°C na presença de 1N de cianoboroidreto de sódio. A diidrazida de ácido adípico (ADH) foi então adicionada durante 3 horas para neutralizar os grupos de aldeído não reagidos. As soluções foram diafiltradas contra 0,02 M de PBS, pH 7,4 (~20 volumes), para remover os compostos não re-

agidos e os polissacarídeos não conjugados, em seguida centrifugadas empregando uma Ultrafiltração de Fluxo Tangencial (Minisette System - Pall BioPharmaceuticals) e cassetes de membrana tipo Omega (Screen Channel - Polietersulfona Hidrofílico) (Handbook, 1999). A metodologia de purificação foi padronizada para processar volumes acima de 2 litros de mistura.

Preparação do Produto de Volume

O volume final foi preparado misturando-se sacarose como estabilizador com uma quantidade adequada do conjugado de volume a fim de obter 5 frascos de dose para humano (10 µg/ 0,5 mL) em condições estéreis.

O produto foi congelado abaixo do ponto eutético. Após a conclusão da fase de sublimação, a temperatura do produto foi gradativamente aumentada. A umidade residual final (1%) foi determinada através de um teste de umidade (técnica de pressão diferencial) e Banho de Nitrogênio, este último conduzido no final da fase de secagem. De um ponto de vista cosmético, o ciclo produziu uma massa seca homogênea branca, demonstrando um resultado satisfatório.

Controle de Qualidade das Vacinas - Ensaios

Físico-Químicos

A análise de cromatografia de exclusão de tamanho líquida de alto desempenho (HPSEC) das amostras de proteína, os polissacarídeos e dos produtos conjugados (50 µL; 0,1-1 mg/ml) foi conduzida empregando uma coluna TSK 4.000 P_{wx1} com salmoura em 0,5 ml/ minuto em um sistema de HPLC Amersham Biosciences com o programa Unicom 4.12 e um detector de UV

em 280 e 206 nm, para detectar os sinais de proteína e açúcar, respectivamente.

Os teores de açúcar e polissacarídeo totais nos intermediários do produto e nos conjugados finais foram determinados pelo método de Bradford e resorcinol e ensaios de HPAEC-PAD, respectivamente (observe, Svennerholm, L. 1957, Biochim. Biophys. Acta, 24:604-611; Bradford, M.M. 1976, Anal. Biochem., 72:248; Ricci e outros, 2001, Vaccine, 19: 1989-1997). Os resultados para CPS foram empregados para calcular as relações de sacarídeo para proteína, obtidos para bateladas de conjugado diferentes (Tabela 3). Este parâmetro foi empregado para avaliar a consistência da produção.

Tabela 3

Relações de sacarídeo-proteína (peso/ peso) de três conjugados Men C diferentes

Conjugado (lotes)	Relação de açúcar:proteína	Dose (10 µg/dose)
28	1:2,12	2665
29	1:2,04	2000
30	1:2,35	2028

A quantidade de grupo amina presente no TTH foi medida por ensaio de TNBSA empregando glicina como padrão (Pierce Instructions para ensaio de TNBSA).

As purezas, identidades/ estruturas de APS e CPS nativos foram avaliadas por RMN ¹H. As amostras dissolvidas em D₂O (~10 mg/ml) mais 0,01% de sulfóxido de dimetila (DMSO) (empregado como um padrão interno) foram executadas em 600 MHz a 40°C. Os grupos de aldeído presentes nos polis-

sacarídeos ativados e na etapa de conjugação foram também monitorados por RMN ^1H empregando as mesmas condições sem 0,01% de DMSO no solvente (Egan, W. 2000, Dev. Biol. Base, Karger, 103: 3-9).

5 O peso molecular dos conjugados e polissacarídeos oxidados e nativos foi determinado por "Dispersão de Luz Laser de Multi-Ângulo" (MALLS) empregando uma faixa de concentração (0,025- 0,4 mg/mL) em 0,4 M de KCl/ 0,05M de acetato de sódio (observe, Jumel e outros, 2002, Biotechnol, Appl. Biochem., 36:219-226).

O polissacarídeo não ligado ou livre no conjugado de volume purificado foi analisado por diferentes métodos, por exemplo, ultrafiltração, a fim de garantir que a presente quantidade é clinicamente segura e eficaz (observe World Health Organization Expert Committee on Biological standardization, 2001, Recommendations for the production & control de meningococcal group C conjugate vaccines (Draft). Geneva, 26-30 de Novembro, Jodar e outros, 2004, Vaccine, 22: 1047-1053).

20 A quantidade de sacarose presente na vacina conjugada liofilizada foi avaliada por HPAEC-PAD (observe, World Health Organization Expert Committee on Biological standardization, 2001, Recommendations for the production & control de meningococcal group C conjugate vaccines (Draft). Geneva, 26-30 de Novembro).

O conjugado de volume purificado foi testado quanto a esterilidade micótica e bacteriana de acordo com os requerimentos de WHO (observe, World Health Organization Ex-

pert Committee on Biological standardization, 2001, Recommendations for the production & control de meningococcal group C conjugate vaccines (Draft). Geneva, 26-30 de Novembro).

5 A umidade residual das vacinas conjugadas liofilizadas foi medida por metodologia de Karl Fischer (Wieland G, 1987, Water determination by Karl Fischer Titration. Theory and Applications. Printed by Git Verlag GMBH, Alemanha). O teor médio é preferivelmente não mais do que 2,5%.

10 O teor de pirogênio das vacinas conjugadas liofilizadas foi determinado "in vitro" e "in vivo" por *Limulus amoebocyte lysate* (LAL: menos do que 100 Unidades Internacionais de endotoxina por g de polissacarídeo) e teste de pirogenicidade em coelhos, respectivamente (observe, World Health Organization Expert Committee on Biological standardization, 2001, Recommendations for the production & control de meningococcal group C conjugate vaccines (Draft). Geneva, 26-30 de Novembro).

Análise Cromatográfica dos Polissacarídeos

20 Oxidados e Nativos do Grupo A Meningocócico e do Conjugado de Polissacarídeo-Proteína.

A fim de controlar o processo da etapa de conjugação, as amostras do Toxóide de Tétano ativo, polissacarídeo oxidado, e produtos conjugados (50 µL; 0,1-1 mg/mL) foram eluídos em uma coluna TSK 4.000 P_{wx1} com salmoura em 0,5 ml/minuto em um sistema de HPLC Amersham Biosciences com o programa Unicom 4.12 e um detector de UV em 280 e 206 nm, para detectar os sinais de proteína e açúcar, respectivamente

(Figura 1).

63

Imunogenicidade dos Conjugados de Polissacarídeo-Proteína do Grupo C Meningocócico em Camundongos

Os camundongos suíços (15-22 g; grupos de 10) foram imunizados intramuscularmente com 2 µg/dose (0,2 mL) de conjugados de polissacarídeo comum ou conjugados de polissacarídeo-proteína (três lotes diferentes) nos dias 0, 21 e 41. O anti-soro foi coletado antes de cada dose e 14 dias após a terceira dose e ensaiado por ELISA quanto aos títulos de IgG total contra o polissacarídeo. Os grupos imunizados foram comparados com um grupo de controle, que recebeu PBS no mesmo volume.

Os ensaios de ELISA foram conduzidos. As placas Immulon tipo II (Dynex) foram revestidas com 100 µL de solução de revestimento contendo polissacarídeos misturados com albumina de soro humano metilada durante a noite. Após a lavagem quatro vezes com 200 µL de tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20, 0,05% de NaN₃), 100 µL de amostras de anti-soro e soro padrão em um início de diluição de 2 vezes de 1/500 (diluído com tampão de diluição contendo PBS, 4% de soro de bezerro recém-nascido, 0,05% de NaN₃) foram adicionados a cada poço. Após a incubação durante a noite, as placas foram lavadas quatro vezes e incubadas com 100 µL de conjugado de molécula total de IgG anti-camundongo de cabra com fosfato alcalino (1/3000 diluições em tampão de diluição) durante duas horas. Após a lavagem (4 x 200 mL), as placas foram incubadas com 100 µL de fosfato de p-nitrofenila (1 mg/mL) durante 30 minutos e a reação foi in-

terrompida com 50 μ L de fosfato de p-nitrofenila (1 mg/mL) durante 30 minutos e a reação foi interrompida com 50 μ L de 0,1 N de NaOH (observe, Gheesling e outros, 1994, J. Clin. Microbiol., 32: 1475-1482). As leituras de ELISA foram medi-
5 das com um leitor de placa (405 nm) e os níveis de anticorpo de anti-polissacarídeo das amostras de anti-soro foram calculadas das leituras de ELISA e da curva padrão do soro padrão co-ensaiado na mesma placa. A média geométrica do nível de anticorpo para cada grupo de camundongo foi calculada
10 (Figura 2).

A atividade bacteriana do soro foi determinada. Diluições de duas vezes de soro foram testadas com um inoculo de 50-70 cfu por poço de crescimento meningocócico de fase logarítmica no Ágar de Soja Tríptica (TSA). O soro obtido
15 de cobaias machos foi empregado como a fonte de complemento (livre de anticorpos bactericidas para sorogrupo C de *N. Meningitidis*). O ensaio foi realizado a 37°C durante 30 minutos, e 150 μ l de TSA com 2% de BSA foi adicionado a cada poço. As culturas quantitativas foram realizadas em 0 e 30 mi-
20 nutos de tempo mais tarde pelo método de declive em duplicata. Os títulos do anticorpo bactericida foram expressados como \log_2 da diluição final que produz pelo menos 50% da morte do inóculo observe Milagres e outros, 1994, Infect. Immun.; 62(10):4419-24) (Figura 3).

25 Descrição

As etapas descritas acima foram demonstradas eficazes na produção, purificação, e controle de vacinas conjugadas Men A e C em quantidades comerciais. Empregando os mé-

65

todos descritos acima, lotes diferentes de conjugados foram preparados por aminação redutiva em produção de escala industrial para produzir grandes volumes do produto final. O procedimento a montante otimiza as etapas de purificação empregando a filtração tangencial a fim de proporcionar produções boas de produtos solúveis sem polissacarídeos livres. Os procedimentos de produção estabelecidos foram reproduzíveis. Os controles de qualidade físico-química e a avaliação imunogênica para Men C foram compatíveis com os três lotes finais obtidos, indicando que as vacinas desenvolvidas são adequadas para teste nos estudos clínicos de fase I.

Os procedimentos descritos acima podem ser aplicados para produção de outras vacinas conjugadas contra diferentes bactérias encapsuladas com adaptações apropriadas.

Todas as referências citadas aqui estão incorporadas aqui por referência em sua totalidade. Na medida em que as publicações e patentes ou pedidos de patentes por referência contradizem a divulgação contida no relatório descritivo, o relatório descritivo é pretendido substituir e/ou tomar precedência sobre qualquer tal material contraditório.

O termo "compreendendo" como empregado aqui, é sinônimo com "incluindo", "contendo", ou "caracterizado pelo", e é inclusivo e não exclui as etapas de método ou elementos adicionais, não relacionados.

Todos os números expressando quantidades de ingredientes, condições de reação, e assim por diante, empregados no relatório descritivo e reivindicações são para serem entendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo

"em cerca de". Conseqüentemente, a menos que indicado ao contrário, os parâmetros numéricos apresentados no relatório descritivo e nas reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas procuradas ser obtidas pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar o pedido da doutrina de equivalentes ao escopo das reivindicações. Cada parâmetro numérico deve ser considerado levando em consideração o número de dígitos significantes e métodos completos ordinários.

10 A descrição acima divulga vários métodos e materiais da presente invenção. Esta invenção é susceptível a modificações nos métodos e materiais, bem como alterações nos equipamentos e métodos de fabricação. Tais modificações se tornarão evidentes para aqueles versados na técnica de uma
15 consideração desta descrição ou prática da invenção divulgada aqui. Conseqüentemente não é pretendido que esta invenção seja limitada às modalidades específicas divulgadas aqui, porém que abranja todas as modificações e alternativas apresentadas no verdadeiro escopo e espírito da invenção como
20 incorporado nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a preparação de uma vacina meningocócica conjugada ao toxóide tetânico em volumes comerciais, caracterizado pelo fato de compreender:

reagir o polissacarídeo meningocócico e um agente oxidante, de modo a obter uma solução de polissacarídeo ativado contendo o grupamento aldeído terminal;

reagir o toxóide tetânico com o cloridrato de hidrazina, em pH ácido, de modo a obter uma solução de toxóide tetânico ativado com o grupamento hidrazida;

purificar por diafiltração a referida proteína tetânica ativada por hidrazina para processar pelo menos cinco litros de solução;

reagir o polissacarídeo meningocócico ativado que contém o grupamento aldeído terminal e a proteína tetânica ativada com hidrazina em pH de 5 a 7, na presença de cianoboroidreto de sódio, de modo a obter um conjugado entre o polissacarídeo meningocócico e o toxóide tetânico;

neutralizar os grupos aldeídos que não reagiram, utilizando a diidrazida do ácido adípico;

purificar por diafiltração a solução resultante para processar um volume de pelo menos dois litros, produzindo uma vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico purificada e concentrar a vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico purificada por ultrafiltração de fluxo tangencial, de modo que uma vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico, purificada, concentrada, capaz de estimular uma resposta imune é produzida em volumes comerciais.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente oxidante compreende NaIO_4 .

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução do polissacarídeo meningocócico ativado por

aldeído é permutada por tampão com um tampão HEPES.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução do polissacarídeo meningocócico ativado contendo o aldeído é permutada por tampão em um pH de 7 a 8.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução da proteína tetânica ativada por hidrazina é permutada por tampão com um tampão de Na₂CO₃.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução da proteína tetânica ativada por hidrazina é permutada por tampão em um pH de 10 a 11.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que um pH da solução da proteína tetânica ativada por hidrazina é aumentado de 7 para 11 antes da proteína tetânica ativada por hidrazina ser permutada por tampão com pH de 10 a 11.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo meningocócico ativado contendo o aldeído reage com a proteína tetânica ativada por hidrazina em uma relação de 1:1,6 a 1:5.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida purificação da solução resultante compreende, a etapa de diafiltração da vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico, por meio da qual os compostos que não reagiram e polissacarídeos meningocócicos não conjugados são removidos, produzindo uma vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico purificada.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, a etapa de adicionar sacarose como um estabilizador à vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico concentrada, produzindo uma vacina meningocócica conjugada com

o toxóide tetânico estabilizada.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a etapa de liofilizar a vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico purificada concentrada, produzindo uma vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico liofilizada.

12. Método para a preparação de uma vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico em volumes comerciais, caracterizado pelo fato de compreender:

reagir um polissacarídeo meningocócico com um agente oxidante, de modo que uma solução do polissacarídeo meningocócico ativado contendo o aldeído é obtida;

permutar o pH da solução tampão do polissacarídeo meningocócico ativado de 7 para 8;

reagir a proteína tetânica com o cloridrato de hidrazina em pH ácido, de modo que uma solução de proteína tetânica ativada contendo hidrazida é obtida;

aumentar o pH da solução da proteína tetânica ativada por hidrazina de 7,0 a 11,0 e posteriormente trocar o pH de 10,0 a 11,0 da solução tampão da proteína tetânica ativada por hidrazina;

purificar por diafiltração a referida solução de proteína tetânica ativada por hidrazina para processar pelo menos cinco litros de solução;

reagir o polissacarídeo meningocócico ativado contendo o aldeído com a proteína tetânica ativada por hidrazina em um pH de 5 a 7 na presença de cianoboroidreto de sódio, de modo que um conjugado entre o polissacarídeo meningocócico é obtido;

neutralizar os grupos aldeído que não reagiram, utilizando a diidrazida do ácido adípico;

purificar por diafiltração a solução resultante para processar um volume de

pelo menos dois litros, produzindo uma vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico purificada e concentrar a vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico purificada por ultrafiltração de fluxo tangencial, de modo que uma vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico, purificada, concentrada, capaz de estimular uma resposta immune é produzida em volumes comerciais.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo meningocócico ativado contendo o aldeído reage com a proteína tetânica ativada por hidrazina em uma relação de 1:1,6 a 1:5.

14. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que compreende, adicionalmente, a etapa de adicionar sacarose como um estabilizador da vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico purificada e concentrada, produzindo uma vacina meningocócica conjugada com o toxóide tetânico estabilizada.

Figura 1

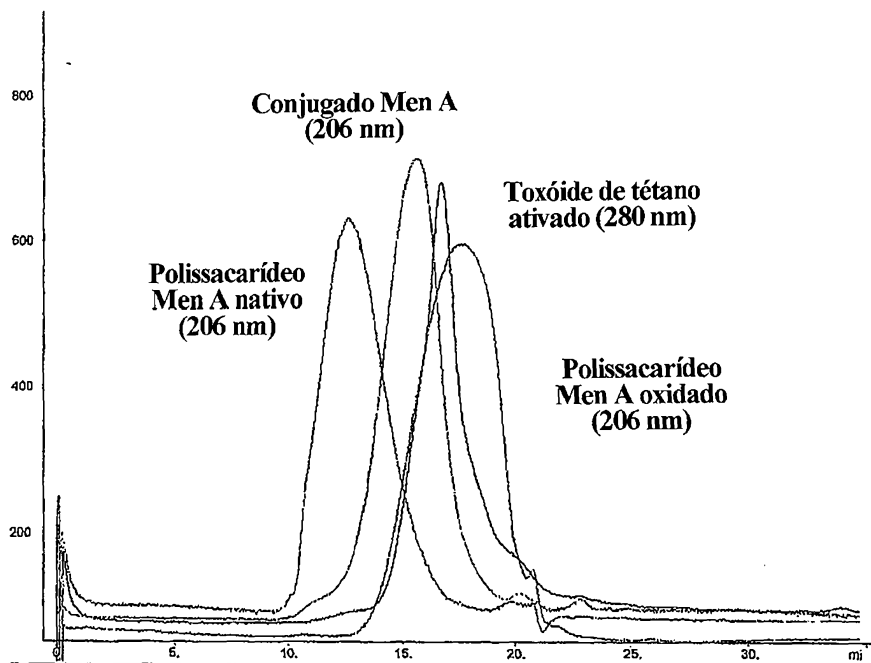


Figura 2

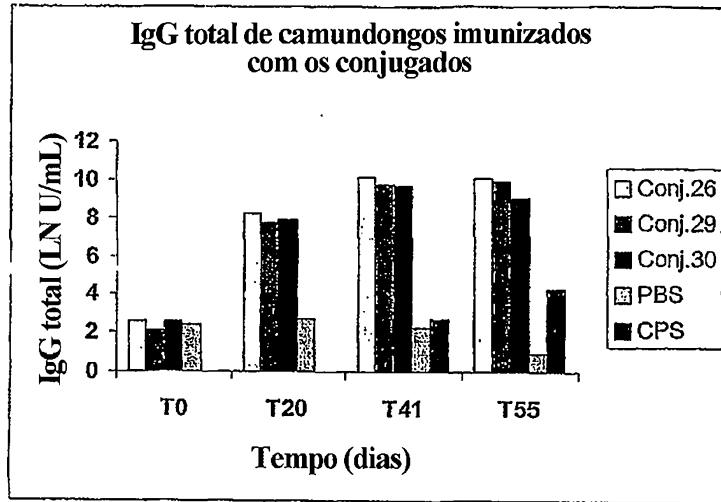


Figura 3

