



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

(11) BR 112015015031-4 B1



(22) Data do Depósito: 13/12/2013

(45) Data de Concessão: 14/07/2020

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UM GLICOCONJUGADO QUE COMPREENDE UM SACARÍDEO CONJUGADO A UMA PROTEÍNA

(51) Int.Cl.: C07H 3/06; A61K 47/00; C07K 1/107; A61K 39/09.

(30) Prioridade Unionista: 20/12/2012 US 61/740,311.

(73) Titular(es): PFIZER INC..

(72) Inventor(es): MINGMING HAN; RAJESH KUMAR KAINTHAN; JIN-HWAN KIM; AVVARI KRISHNA PRASAD.

(86) Pedido PCT: PCT IB2013060933 de 13/12/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/097099 de 26/06/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/06/2015

(57) Resumo: RESUMO PROCESSO DE GLICOCONJUGAÇÃO A presente revelação refere-se, em geral, a métodos para preparar glicoconjugados contendo um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora pelo uso de agente/oxidante relacionado a radical nitroxila estável como um agente de oxidação, a composições imunogênicas que compreendem esses glicoconjugados, e a métodos para o uso desses glicoconjugados e composições imunogênicas.

“MÉTODO PARA PRODUZIR UM GLICOCONJUGADO QUE COMPREENDE UM SACARÍDEO CONJUGADO A UMA PROTEÍNA”.

CAMPO

[001] A presente revelação refere-se, em geral, a métodos para preparar glicoconjugados contendo um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora através do uso de TEMPO/NCS como um agente de oxidação, a composições imunogênicas que compreendem esses glicoconjugados, e a métodos para uso desses glicoconjugados e composições imunogênicas. A presente revelação também se refere a métodos para preparar glicoconjugados contendo um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora, através do uso de radicais estáveis de nitroxila ou nitróxido, tais como compostos de piperidina-N-óxi ou pirrolidina-N-óxi na presença de um oxidante para oxidar seletivamente hidroxilas primárias do dito sacarídeo, a composições imunogênicas que compreendem esses glicoconjugados, e a métodos para uso desses glicoconjugados e composições imunogênicas.

FUNDAMENTOS

[002] As vacinas conjugadas de proteína polissacarídica são fabricadas usando polissacarídeos, geralmente provenientes do revestimento superficial de bactérias, ligados a carreadores protéicos. A ligação química do polissacarídeo e carreador protéico induz uma resposta imune contra bactérias que exibem o polissacarídeo contido na vacina ou em sua superfície, evitando, assim, a doença. De modo correspondente, a vacinação usando polissacarídeos de bactérias patogênicas consiste em uma estratégia potencial para estimular a imunidade do hospedeiro. Os polissacarídeos que revestem bactérias variam consideravelmente, mesmo em uma única espécie de bactérias. Por exemplo, em *Streptococcus pneumoniae* (um causador principal de meningite, pneumonia, e graves doenças invasivas em

bebês e em crianças jovens ao redor do mundo) existem mais de 90 sorotipos diferentes devido à variação no revestimento polissacarídico bacteriano. Portanto, vacinas de polissacarídeo geralmente consistem em um painel de polissacarídeos para aumentar a proteção.

[003] Muito embora os polissacarídeos sejam imunogênicos por si sós, a conjugação de polissacarídeos em carreadores protéicos foi usada para aperfeiçoar a imunogenicidade. A proteína carreadora pode ser um antígeno protéico relacionado proveniente do patógeno alvo, induzindo a resposta imune específica a esse patógeno, ou uma proteína genericamente imunogênica que serve mais como um adjuvante ou estimulante de resposta imune geral.

[004] Vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína pneumocócicas multivalentes foram licenciadas por muitos anos e se provaram ser valiosas em evitar doenças pneumocócicas em bebês e, recentemente, foram recomendadas para adultos.

SUMÁRIO

[005] Em um aspecto, a presente revelação proporciona um método para produzir um glicoconjugado que compreende um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora, que compreende as etapas de: a) reagir um sacarídeo com 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilóxi (TEMPO) e N-clorossuccinimida (NCS) em um solvente aquoso para produzir um sacarídeo ativado; e b) reagir o sacarídeo ativado com uma proteína carreadora que compreende um ou mais grupos amina. Em um aspecto adicional, o grau de oxidação do sacarídeo ativado varia de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 5, de 3 a 40, de 3 a 30, de 3 a 20, de 3 a 10, de 4 a 40, de 4 a 30, de 4 a 20, de 4 a 10, de 5 a 30, de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 10, de 6 a 50, de 6 a 40, de 6 a 30, de 6 a 20, de 6 a 15, de 6 a 14, de 6 a 13, de 6 a 12, de 6 a 11, de 6 a 10, de 7 a 40, de 7 a 30, de 7 a 20, de 7 a 15, de 7 a 14, de 7 a 13, de 7 a 12, de 7 a 11, de 7 a 10, de 8 a 40,

de 8 a 30, de 8 a 20, de 8 a 15, de 8 a 14, de 8 a 13, de 8 a 13, de 8 a 12, de 8 a 11, de 8 a 10, de 9 a 40, de 9 a 30, de 9 a 20, de 9 a 15, de 10 a 40, de 10 a 30, de 10 a 20, ou de 10 a 15. Em um aspecto adicional, o grau de oxidação do sacarídeo ativado é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou 40.

[006] Em um aspecto adicional, a presente revelação proporciona um método para produzir um glicoconjugado que compreende um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora, que compreende as etapas de: a) reagir um sacarídeo com um composto de radical estável de nitroxila ou nitróxido, tal como compostos de piperidina-N-óxi ou pirrolidina-N-óxi, na presença de um oxidante para oxidar seletivamente hidroxilas primárias do dito sacarídeo para produzir um sacarídeo ativado contendo grupos aldeído; e b) reagir o sacarídeo ativado com uma proteína carreadora que compreende um ou mais grupo amina.

[007] Na dita reação, o oxidante atual é o sal N-oxoamônio, em um ciclo catalítico. De preferência, os compostos de radical estável de nitroxila ou nitróxido têm a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário em aldeídos, na presença de um oxidante, sem sobre-oxidação em ácidos carboxílicos.

[008] Em um aspecto, a etapa a) da reação é realizada em um solvente aquoso. Em outro aspecto, a etapa a) é realizada em um solvente aprótico. Em um aspecto, a etapa a) é realizada em um solvente de DMSO (dimetil sulfóxido), Dimetilacetamida (DMA), Sulfolano, N-Metil-2-pirrolidona (NMP), Hexametilfosforamida (HMPA) ou em DMF (dimetilformamida).

[009] Em um aspecto, os grupos aldeídos não-reagidos são convertidos de volta em álcoois primários durante uma etapa de capeamento, usando boroidreto, após conjugação com a proteína

carreadora, minimizando, assim, a modificação de epítipo de sacarídeo durante as etapas de modificação que envolvem oxidação seguida por conjugação.

[010] Em um aspecto, os ditos compostos de radical estável de nitroxila ou nitróxido são compostos de piperidina-N-óxi ou pirrolidina-N-óxi. De preferência, os dito compostos têm a capacidade de oxidar álcoois primários na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem afetar grupos hidroxila secundários. Com mais preferência, os ditos compostos têm a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem sobre-oxidação em grupos carboxila.

[011] Em um aspecto, o dito composto de radical estável de nitroxila ou nitróxido porta uma porção TEMPO ou uma porção PROXIL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinilóxi). De preferência, o dito composto tem a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem afetar grupos hidroxila secundários. Com mais preferência, o dito composto tem a capacidade de oxidar seletivamente álcoois primários na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem sobre-oxidação em grupos carboxila.

[012] Em um aspecto, o dito composto de radial estável de nitroxila é TEMPO ou um derivado do mesmo. Em um aspecto, o dito composto de radial estável de nitroxila é selecionado a partir do grupo que consiste em TEMPO, 2,2,6,6-Tetrametil-4-(metil sulfonilóxi)-1-piperidinoxi, 4-Fosfonooxi-TEMPO, 4-Oxo-TEMPO, 4-Metóxi-TEMPO, 4-Isotiocianato-TEMPO, radical livre de 4-(2-Iodoacetamido)-TEMPO, 4-Hidróxi-TEMPO, 4-Ciano-TEMPO, 4-Carbóxi-TEMPO, 4-(2-Bromoacetamido)-TEMPO, 4-Amino-TEMPO, 4-Acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil. De preferência, o dito composto de radial estável de nitroxila é TEMPO.

[013] Em um aspecto adicional, o dito composto de radical estável de nitroxila é selecionado a partir do grupo que consiste em 3 β -DOXIL-5 α -colestano, ácido 5-DOXIL-esteárico, ácido 16-DOXIL-esteárico, Metil 5-DOXIL-estearato, 3-(Aminometil)-PROXIL, 3-Carbamoil-PROXIL, 3-Carbamoil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-1-oxil, 3-Carbóxi-PROXIL, 3-Ciano-PROXIL.

[014] Em um aspecto, o dito oxidante é uma molécula portando uma porção N-halo. De preferência, a dita molécula tem a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um composto de radical nitroxila.

[015] Em um aspecto, o dito oxidante é selecionado a partir do grupo que consiste em N-Clorossuccinimida, N-Bromossuccinimida, N-Iodossuccinimida, ácido Dicloroisocianúrico, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona, ácido Dibromoisocianúrico, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona, ácido Diiodoisocianúrico e 1,3,5-triiodo-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona. De preferência, o dito oxidante é N-Clorossuccinimida.

[016] Em um aspecto, o grau de oxidação do sacarídeo ativado varia de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 5, de 3 a 40, de 3 a 30, de 3 a 20, de 3 a 10, de 4 a 40, de 4 a 30, de 4 a 20, de 4 a 10, de 5 a 30, de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 10, de 6 a 50, de 6 a 40, de 6 a 30, de 6 a 20, de 6 a 15, de 6 a 14, de 6 a 13, de 6 a 12, de 6 a 11, de 6 a 10, de 7 a 40, de 7 a 30, de 7 a 20, de 7 a 15, de 7 a 14, de 7 a 13, de 7 a 12, de 7 a 11, de 7 a 10, de 8 a 40, de 8 a 30, de 8 a 20, de 8 a 15, de 8 a 14, de 8 a 13, de 8 a 13, de 8 a 12, de 8 a 11, de 8 a 10, de 9 a 40, de 9 a 30, de 9 a 20, de 9 a 15, de 10 a 40, de 10 a 30, de 10 a 20, ou de 10 a 15. Em um aspecto adicional, o grau de oxidação do sacarídeo ativado é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou 40.

[017] Em um aspecto, o sacarídeo é reagido com 0,1 a 10 equivalentes molares de oxidante. De preferência, o sacarídeo é reagido com 0,2 a 5, 0,5 a 2,5 ou 0,5 a 1,5 equivalentes molares de oxidante. Em um aspecto, o polissacarídeo é reagido com cerca de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 ou 5 equivalentes molares de oxidante.

[018] Em um aspecto, o composto de radical estável de nitroxila ou nitróxido está presente em uma quantidade catalítica. Em um aspecto, o sacarídeo é reagido com menos de cerca de 0,3 equivalente molar de composto de radical estável de nitroxila ou nitróxido. Em um aspecto, o sacarídeo é reagido com menos de cerca de 0,005 equivalente molar de composto de radical estável de nitroxila ou nitróxido. Em um aspecto, o sacarídeo é reagido com cerca de 0,005, 0,01, 0,05 ou 0,1 equivalente molar de composto de radical estável de nitroxila ou nitróxido.

[019] Em um aspecto adicional, o sacarídeo é um polissacarídeo capsular bacteriano. Em outro aspecto, o sacarídeo é um oligo ou polissacarídeo sinteticamente derivado. Em um aspecto, o polissacarídeo capsular é derivado a partir de *S. pneumonia* (Pn). Em um aspecto adicional, o polissacarídeo capsular é selecionado a partir de polissacarídeos capsulares de Pn-serotipo 10A, Pn-serotipo 12F, e Pn-serotipo 33F. Por exemplo, em um aspecto, o polissacarídeo capsular é um polissacarídeo capsular de Pn-serotipo 12F.

[020] Em um aspecto adicional, o polissacarídeo capsular é derivado a partir de *N. meningitidis*. Em um aspecto, o polissacarídeo capsular é selecionado a partir de polissacarídeos capsulares meningocócicos (Mn)-serotipo A, C, W135, e Y.

[021] Em um aspecto adicional, o polissacarídeo capsular é um polissacarídeo capsular meningocócico (Mn)-serotipo X.

[022] Em um aspecto adicional, o polissacarídeo capsular é

derivado a partir de *Streptococcus do Grupo B (GBS)*. Em um aspecto, o polissacarídeo capsular é selecionado a partir de serotipos GBS Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII.

[023] Em um aspecto, a presente revelação proporciona qualquer um dos métodos revelados no presente documento em que a proteína carreadora é uma toxina do tétano, difteria, coqueluche, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus* ou *Streptococcus*. Em um aspecto a proteína carreadora é CRM₁₉₇.

[024] Em um aspecto adicional, a presente revelação proporciona um método conforme descrito no presente documento, em que antes da etapa a), o sacarídeo é hidrolisado em um peso molecular variando de 100 a 400 kDa. Por exemplo, em um aspecto, o peso molecular varia de 100 a 350 kDa, de 100 a 300 kDa, de 100 a 250 kDa, de 100 a 200 kDa, de 100 a 150 kDa, de 200 a 400 kDa, de 200 a 350 kDa, de 200 a 300 kDa, de 200 a 250 kDa, de 300 a 400 kDa, ou de 300 a 350 kDa.

[025] Em um aspecto adicional, a presente revelação proporciona qualquer um dos métodos proporcionados no presente documento que compreendem, ainda, a etapa de purificar o polissacarídeo ativado antes da etapa b). Em um aspecto adicional, os métodos compreendem, ainda, a etapa de adicionar um agente de redução seguindo a etapa b). Em um aspecto, o agente de redução é NaCNBH₃. Em um aspecto adicional, os métodos compreendem, ainda, a etapa de adicionar NaBH₄ seguindo a adição de NaCNBH₃. Em um aspecto adicional, o método compreende uma etapa de purificação seguindo a adição de NaBH₄.

[026] Em outro aspecto, a presente revelação proporciona um glicoconjugado produzido, ou obténível através de qualquer um dos métodos revelados no presente documento. Por exemplo, em um aspecto, a presente revelação proporciona um glicoconjugado que

compreende um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora que é produzida ou obtenível pelo método que compreende as etapas de: a) reagir um sacarídeo com 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilóxi (TEMPO) e N-clorossuccinimida (NCS) em um solvente aquoso para produzir um sacarídeo ativado; e b) reagir o sacarídeo ativado com uma proteína carreadora que compreende um ou mais grupos amina. Em um aspecto adicional, a presente revelação proporciona um glicoconjugado que compreende um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora que é produzida ou obtenível pelo método que compreende as etapas de: a) reagir um sacarídeo com um composto de radical estável de nitroxila ou nitróxido e um oxidante para produzir um sacarídeo ativado contendo grupos aldeídos; e b) reagir o sacarídeo ativado com uma proteína carreadora que compreende um ou mais grupos amina. Os compostos de radical estável de nitroxila e oxidante podem ser conforme definidos nas páginas 2 a 4 acima.

[027] Em um aspecto adicional, a presente revelação proporciona uma composição imunogênica que compreende qualquer um dos glicoconjugados revelados no presente documento e um excipiente, carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Em um aspecto adicional, a composição imunogênica compreende um antígeno adicional. Em um aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um antígeno protéico ou um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular derivado a partir de *S. pneumoniae*. Por exemplo, em um aspecto, o antígeno adicional compreende um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular selecionado a partir de polissacarídeos capsulares de Pn-serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F e 23F. Em um aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um antígeno protéico ou um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular derivado a partir de *N. meningitidis*. Em um aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um

glicoconjugado de um polissacarídeo capsular selecionado a partir de polissacarídeos capsulares de serotipos A, C, W135 e Y. Em um aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular a partir de polissacarídeos capsulares de serotipo X. Em um aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular derivado a partir de *Streptococcus do Grupo B* (GBS). Em um aspecto, o antígeno adicional compreende um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular selecionado a partir de serotipos GBS Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII.

[028] Em um aspecto adicional, a presente revelação proporciona qualquer uma das composições imunogênicas reveladas no presente documento, que compreende, ainda, um adjuvante. Em um aspecto, o adjuvante é um adjuvante à base de alumínio. Em um aspecto adicional, o adjuvante à base de alumínio é selecionado a partir do grupo que consiste em fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, e hidróxido de alumínio.

[029] Em outro aspecto, a presente revelação proporciona um método para prevenir, tratar ou aliviar uma infecção, doença ou condição bacteriana em um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade imunologicamente eficaz de qualquer uma das composições imunogênicas reveladas no presente documento. Em um aspecto, a infecção, doença ou condição está associada à bactéria *S. pneumoniae*. Em um aspecto adicional, a infecção, doença ou condição está associada à bactéria *N. meningitidis*.

[030] Em outro aspecto, a presente revelação proporciona um método para induzir uma resposta imune protetora em um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade imunologicamente eficaz de qualquer uma das composições imunogênicas reveladas no presente documento.

[031] Em outro aspecto, a presente revelação proporciona uma composição imunogênica que compreende um Pn-serotipo 12F conjugado a uma proteína carreadora em que o conjugado é estável. Por exemplo, em um aspecto, a presente revelação proporciona uma composição imunogênica que compreende um Pn-serotipo 12F conjugado a uma proteína carreadora, em que a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 12F livre na composição é menor que 35% após 120 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 12F livre é menor que 30%, menor que 28%, menor que 27%, menor que 26%, ou menor que 25% após 120 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 12F livre é menor que 35%, menor que 30%, menor que 28%, menor que 27%, menor que 26%, ou menor que 25% após 90 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 12F livre é menor que 35%, menor que 30%, menor que 28%, menor que 27%, menor que 26%, ou menor que 25% após 60 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 12F livre é menor que 35%, menor que 30%, menor que 28%, menor que 27%, menor que 26%, ou menor que 25% após 30 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a presente revelação proporciona uma composição que compreende Pn-serotipo 3, 10A, ou 33F conjugado a uma proteína carreadora, em que a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 3, 10A, ou 33F livre, respectivamente, na composição é menor que 35% após 120 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 3, 10A, ou 33F livre é menor que 30%, menor que 28%, menor que 27%, menor que 26%, ou menor que 25% após 120 dias a

partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 3, 10A, ou 33F livre é menor que 35%, menor que 30%, menor que 28%, menor que 27%, menor que 26%, ou menor que 25% após 90 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 3, 10A, ou 33F livre é menor que 35%, menor que 30%, menor que 28%, menor que 27%, menor que 26%, ou menor que 25% após 60 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto adicional, a quantidade de polissacarídeo de Pn-serotipo 3, 10A, ou 33F livre é menor que 35%, menor que 30%, menor que 28%, menor que 27%, menor que 26%, ou menor que 25% após 30 dias a partir de quando a mesma foi preparada. Em um aspecto, a quantidade de polissacarídeo livre conforme discutido anteriormente é medida a 25°C. Em um aspecto, a proteína carreadora nas composições reveladas acima consiste em uma toxina do tétano, difteria, coqueluche, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus* ou *Streptococcus*. Em um aspecto adicional, a proteína carreadora é CRM₁₉₇.

[032] A presente revelação proporciona, ainda, uma composição imunogênica que compreende qualquer um dos glicoconjugados revelados acima e um excipiente, carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Em um aspecto adicional, essas composições imunogênicas compreendem um antígeno adicional. Por exemplo, em um aspecto, o antígeno adicional compreende um antígeno protéico ou um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular derivado a partir de *S. pneumoniae*. Em um aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular selecionado a partir de polissacarídeos capsulares de Pn-serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, e 23F. Em outro aspecto adicional, o antígeno

adicional compreende um antígeno protéico ou um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular derivado a partir de *N. meningitidis*. Ainda em outro aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular selecionado a partir de polissacarídeos capsulares de serotipos A, C, W135 e Y. Em um aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular a partir de polissacarídeos capsulares de serotipo X. Em um aspecto adicional, o antígeno adicional compreende um glicoconjugado de um polissacarídeo capsular a partir do *Streptococcus do Grupo B (GBS)*. Em um aspecto, o polissacarídeo capsular é selecionado a partir de serotipos GBS Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII.

[033] Em outro aspecto adicional, essas composições imunogênicas compreendem, ainda, um adjuvante. Por exemplo, em um aspecto, o adjuvante é um adjuvante à base de alumínio. Em um aspecto adicional, o adjuvante à base de alumínio é selecionado a partir do grupo que consiste em fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, e hidróxido de alumínio.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[034] A Figura 1 mostra a estrutura do polissacarídeo capsular de Pn-serotipo 12F.

[035] A Figura 2 mostra a dependência de N-Clorossuccinimida na reação de oxidação de Tempo/NCS sobre o grau de oxidação (DO).

[036] A Figura 3 mostra a estrutura do polissacarídeo capsular de Pn-serotipo 10A.

[037] A Figura 4 mostra a estrutura do polissacarídeo capsular de Pn-serotipo 33F.

[038] A Figura 5 mostra a estrutura do polissacarídeo capsular de Pn-serotipo 3.

[039] A Figura 6 mostra o mecanismo putativo de

oxidação/conjugação de Pn-serotipo 12F usando TEMPO/NCS.

[040] A Figura 7 mostra a comparação de estabilidade de conjugados de Pn-serotipo 12F preparados usando oxidação de periodato vs. oxidação de TEMPO/NCS.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[041] A presente revelação pode ser entendida mais prontamente com referência à descrição detalhada a seguir das várias modalidades da revelação e dos exemplos incluídos no presente documento. Exceto onde definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado conforme comumente entendido por um indivíduo com conhecimento comum na técnica à qual a revelação pertence. Muito embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente documento possam ser usados na prática ou testes da presente revelação, determinados métodos e materiais preferenciais são descritos no presente documento. Na descrição das modalidades e nas reivindicações, uma terminologia particular será usada de acordo com as definições apresentadas abaixo.

[042] Conforme o uso em questão, as formas no singular “um”, “uma”, “o”, e “a” incluem as referências no plural exceto onde indicado em contrário. Logo, por exemplo, referências ao “método” incluem um ou mais métodos, e/ou etapas do tipo descrito no presente documento e/ou que se tornarão aparentes a um indivíduo com conhecimento comum na técnica mediante a leitura desta revelação.

[043] Conforme o uso em questão, o termo “cerca de” significa dentro de uma faixa estatisticamente significativa de um valor, tal como uma faixa de concentração definida, duração de tempo, peso molecular, temperatura ou pH. Essa faixa pode estar dentro de uma ordem de magnitude, tipicamente dentro de 20%, mais tipicamente dentro de 10%, e ainda mais tipicamente dentro de 5% ou dentro de

1% de um dado valor ou faixa. Ocasionalmente, essa faixa pode estar dentro erro experimental típico de métodos padrão usados para medição e/ou determinação de um dado valor ou faixa. A variação permissível abrangida pelo termo “cerca de” dependerá do sistema particular em estudo, e pode ser prontamente avaliada por um indivíduo com conhecimento comum na técnica. Sempre que uma faixa for citada neste pedido, todo número inteiro dentro da faixa também é contemplado como uma modalidade da revelação.

[044] Nota-se que nesta revelação, termos como “compreende,” “compreendido,” “compreendendo,” “contém,” “contendo” e similares podem ter o significado atribuído aos mesmos no direito patentário norte-americano; por exemplo, podem significar “inclui,” “incluído,” “incluindo” e similares. Esses termos se referem à inclusão de ingredientes particulares ou um conjunto de ingredientes sem excluir nenhum outro ingrediente. Termos como “que consiste essencialmente em” e “consiste essencialmente em” têm o significado atribuído aos mesmos no direito patentário norte-americano; por exemplo, permitem a inclusão de ingredientes ou etapas adicionais que não deprecie as características inovadoras ou básicas da revelação, isto é, excluem ingredientes ou etapas não-citadas adicionais que depreciam as características inovadoras ou básicas da revelação. Os termos “consiste em” e “que consiste em” têm o significado atribuído aos mesmos no direito patentário norte-americano; isto é, que esses termos sejam limitados. De modo correspondente, esses termos se referem à inclusão de um ingrediente particular ou um conjunto de ingredientes e a exclusão de todos os outros ingredientes.

[045] Conforme o uso em questão, o termo “sacarídeo” pode ser usado para se referir a um polissacarídeo, um oligossacarídeo, ou um monossacarídeo.

[046] Conforme o uso em questão, o termo “grau de oxidação”

em referência a um sacarídeo se refere à razão dos moles de unidade de repetição de sacarídeo por mole de aldeído. O grau de oxidação de um sacarídeo pode ser determinado usando métodos rotineiros conhecidos pelos indivíduos versados na técnica.

[047] O termo “conjugados” ou “glicoconjugados” conforme o uso em questão se refere a um sacarídeo covalentemente conjugado a uma proteína carreadora. Os glicoconjugados da revelação e as composições imunogênicas que os compreendem podem conter certa quantidade de sacarídeo livre.

[048] O termo “sacarídeo livre” conforme o uso em questão significa um sacarídeo que não seja covalentemente conjugado à proteína carreadora, mas, no entanto, esteja presente na composição de glicoconjugado. O sacarídeo livre pode ser não-covalentemente associado (isto é, não-covalentemente ligado, absorvido, ou aprisionado) ao glicoconjugado de sacarídeo conjugado-proteína carreadora. Os termos “polissacarídeo livre” e “polissacarídeo capsular livre” podem ser usados no presente documento para transmitir o mesmo significado em relação a glicoconjugados em que o sacarídeo é um polissacarídeo ou um polissacarídeo capsular, respectivamente.

[049] Conforme o uso em questão, “conjugar,” “conjugado(a)” e “conjugando” se referem a um processo através do qual um sacarídeo, por exemplo, um polissacarídeo capsular bacteriano, é covalentemente fixado a uma molécula carreadora ou proteína carreadora. A conjugação pode ser realizada de acordo com os métodos descritos abaixo ou por outros processos conhecidos na técnica. A conjugação acentua a imunogenicidade do polissacarídeo capsular bacteriano.

[050] O termo “indivíduo” se refere a um mamífero, incluindo um ser humano, ou a um pássaro, peixe, réptil, anfíbio ou qualquer outro animal. O termo “indivíduo” também inclui animais domésticos ou animais de pesquisa. Exemplos não-limitantes de animais domésticos

ou animais de pesquisa incluem: cães, gatos, porcos, coelhos, ratos, camundongos, gerbilos, hamsters, porquinhos-da-Índia, furões, macacos, aves, cobras, lagartos, peixes, tartarugas, e sapos. O termo “indivíduo” também inclui animais de fazenda. Exemplos não-limitantes de animais de fazenda incluem: alpacas, bisões, camelos, gado, cervos, porcos, cavalos, lhamas, mulas, burros, carneiros, bodes, coelhos, renas, iaques, galinhas, gansos e perus.

GLICOCONJUGADOS

[051] A presente revelação se refere a métodos para preparar glicoconjugados que compreendem um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora, em particular, utilizando-se um composto de radical estável de nitroxila ou nitróxido, para oxidar seletivamente álcoois primários do sacarídeo em aldeídos, usando, ainda, um oxidante. Em um aspecto, os ditos compostos de radical estável de nitroxila são compostos de piperidina-N-óxi ou pirrolidina-N-óxi. De preferência, os ditos compostos têm a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário em aldeídos na presença de um oxidante, sem sobre-oxidação em ácidos carboxílicos e sem afetar grupos hidroxila secundários. Em um aspecto, o dito composto de radical estável de nitroxila é uma molécula portando uma porção TEMPO ou uma porção PROXIL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinilóxi). De preferência, a dita molécula tem a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem afetar os grupos hidroxila secundários. Com mais preferência, a dita molécula tem a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem sobre-oxidação em grupos carboxila. Em um aspecto, o dito composto de radical estável de nitroxila é selecionado a partir dos grupos que consistem em TEMPO, 2,2,6,6-Tetrametil-4-(metil sulfonilóxi)-1-piperidinoxi, 4-Fosfonooxi-TEMPO, 4-Oxo-TEMPO, 4-Metóxi-TEMPO, 4-Isotiocianato-TEMPO,

radial livre de 4-(2-Iodoacetamido)-TEMPO, 4-Hidróxi-TEMPO, 4-Ciano-TEMPO, 4-Carbóxi-TEMPO, 4-(2-Bromoacetamido)-TEMPO, 4-Amino-TEMPO, 4-Acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil. De preferência, o dito composto de radical estável de nitroxila é TEMPO. Em um aspecto adicional, o dito composto de radical estável de nitroxila é selecionado a partir dos grupos que consistem em 3 β -DOXIL-5 α -colestano, ácido 5-DOXIL-esteárico, ácido 16-DOXIL-esteárico, Metil 5-DOXIL-estearato, 3-(Aminometil)-PROXIL, 3-Carbamoil-PROXIL, 3-Carbamoil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-1-oxil, 3-Carbóxi-PROXIL, 3-Ciano-PROXIL. Em um aspecto, o oxidante é uma molécula portando uma porção N-halo. De preferência, a dita molécula tem a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um composto de radical nitroxila. Em um aspecto, o dito oxidante é selecionado a partir do grupo que consiste em N-Clorossuccinimida, N-Bromossuccinimida, N-Iodossuccinimida, ácido Dicloroisocianúrico, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona, ácido Dibromoisocianúrico, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona, ácido Diiodoisocianúrico e 1,3,5-triiodo-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona. De preferência, o dito oxidante é N-Clorossuccinimida.

[052] Em um aspecto, a presente revelação se refere a métodos para preparar glicoconjugados que compreendem um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora, em particular, utilizando-se radical livre de 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidinilóxi (TEMPO) para oxidar álcoois primários do sacarídeo em aldeídos usando N-Clorossuccinimida (NCS) como o co-oxidante.

[053] Nos glicoconjugados da revelação, o sacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em um polissacarídeo, um oligossacarídeo, e um monossacarídeo, e a proteína carreadora é selecionada a partir de qualquer carreador adequado conforme descrito no presente documento ou conhecido por indivíduos versados

na técnica. Em algumas modalidades, o sacarídeo é um polissacarídeo, em particular, um polissacarídeo capsular bacteriano, tal como *Streptococcus pneumoniae* serotipo 10A (Pn-serotipo 10A), Pn-serotipo 12F, ou Pn-serotipo 33F. Em algumas modalidades, a proteína carreadora é CRM₁₉₇.

[054] Os polissacarídeos capsulares podem ser preparados por técnicas padrão conhecidas pelos indivíduos versados na técnica. Por exemplo, os polissacarídeos capsulares podem ser preparados a partir de uma variedade de serotipos, tais como 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F de *Streptococcus pneumoniae*. Esses conjugados pneumocócicos são preparados por processos separados e formulados em uma formulação de dosagem única. Por exemplo, em uma modalidade, cada serotipo de polissacarídeo pneumocócico é desenvolvido em um meio à base de soja. Os polissacarídeos individuais são, então, purificados através de centrifugação, precipitação, ultra-filtração, e cromatografia em coluna. Os polissacarídeos purificados são quimicamente ativados para tornar os sacarídeos (isto é, sacarídeos ativados) capazes de reagir com a proteína carreadora. Uma vez ativados, cada polissacarídeo capsular é separadamente conjugado a uma proteína carreadora para formar um glicoconjugado. Em uma modalidade, cada polissacarídeo capsular é conjugado à mesma proteína carreadora. A ativação química dos polissacarídeos e a subsequente conjugação à proteína carreadora podem ser alcançadas por meios convencionais. Vide, por exemplo, as Patentes N^{os} U.S. 4.673.574, U.S. 4.902.506, U.S. 7.709.001, e U.S. 7.955.605.

[055] Em uma modalidade, o glicoconjugado da revelação tem um peso molecular entre cerca de 50 kDa e cerca de 20.000 kDa. Em outra modalidade, o glicoconjugado tem um peso molecular entre cerca de 200 kDa e cerca de 10.000 kDa. Em outro modalidade, o

glicoconjugado tem um peso molecular entre cerca de 500 kDa e cerca de 5.000 kDa. Em uma modalidade, o glicoconjugado tem um peso molecular entre cerca de 1.000 kDa e cerca de 3.000 kDa. Em outras modalidades, o glicoconjugado tem um peso molecular entre cerca de 600 kDa e cerca de 2.800 kDa; entre cerca de 700 kDa e cerca de 2.700 kDa; entre cerca de 1.000 kDa e cerca de 2.000 kDa; entre cerca de 1.800 kDa e cerca de 2.500 kDa; entre cerca de 1.100 kDa e cerca de 2.200 kDa; entre cerca de 1.900 kDa e cerca de 2.700 kDa; entre cerca de 1.200 kDa e cerca de 2.400 kDa; entre cerca de 1.700 kDa e cerca de 2.600 kDa; entre cerca de 1.300 kDa e cerca de 2.600 kDa; entre cerca de 1.600 kDa e cerca de 3.000 kDa. Qualquer número inteiro dentro de qualquer uma das faixas anteriores é contemplado como uma modalidade da revelação.

[056] Recursos inovadores dos glicoconjugados da revelação incluem os perfis de peso molecular dos sacarídeos e conjugados resultantes, a razão entre lisinas conjugadas por proteína carreadora e o número de lisinas covalentemente ligadas ao polissacarídeo, o número de ligações covalentes entre a proteína carreadora e o sacarídeo como uma função de unidades de repetição do sacarídeo, e a quantidade relativa de sacarídeo livre comparado ao sacarídeo total.

[057] Em outra modalidade, o polissacarídeo é um polissacarídeo capsular derivado a partir de *Neisseria meningitidis*. Em algumas modalidades, o polissacarídeo capsular é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos capsulares de serotipo A, B, C, W135, X e Y de *N. meningitidis*. Em uma modalidade, o polissacarídeo capsular é um polissacarídeo capsular de serotipo C. Em outra modalidade, o polissacarídeo capsular é um polissacarídeo capsular de serotipo W135. Em outra modalidade, o polissacarídeo capsular é um polissacarídeo capsular de serotipo Y.

[058] Em algumas modalidades, o glicoconjugado da revelação

compreende um polissacarídeo capsular bacteriano, em que o polissacarídeo capsular tem um peso molecular entre 10 kDa e 2.000 kDa ou entre 50 kDa e 1.000 kDa. Em algumas modalidades, o polissacarídeo capsular é derivado a partir de *S. pneumoniae* ou *N. meningitidis*. Em algumas modalidades, o polissacarídeo capsular é derivado a partir de *S. pneumoniae* e é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos capsulares de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F. Em outras modalidades, o polissacarídeo capsular é derivado a partir de *N. meningitidis* e é selecionado a partir do grupo que consiste em polissacarídeos capsulares de serotipo A, B, C, W135, X e Y.

[059] Em uma modalidade, a revelação proporciona um glicoconjugado que compreende um polissacarídeo capsular covalentemente conjugado a uma proteína carreadora, tendo um ou mais dos recursos a seguir: o polissacarídeo tem um peso molecular entre 50 kDa e 1.000 kDa; o glicoconjugado tem um peso molecular entre 1.000 kDa a 3.000 kDa; e o conjugado compreende menos de cerca de 45% de polissacarídeo livre em relação ao polissacarídeo total. Em algumas modalidades, o polissacarídeo tem um peso molecular entre 10 kDa e 2.000 kDa. Em algumas modalidades, o glicoconjugado tem um peso molecular entre 50 kDa e 20.000 kDa. Em outras modalidades, o glicoconjugado tem um peso molecular entre 200 kDa e 10.000 kDa. Em outras modalidades, o conjugado compreende menos de cerca de 30%, 20%, 15%, 10%, ou 5% de polissacarídeo livre em relação ao polissacarídeo total. A quantidade de polissacarídeo livre pode ser medida como uma função de tempo, por exemplo, após 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 120 dias, ou até mais, após o conjugado ter sido preparado.

[060] O número de resíduos de lisina na proteína carreadora conjugada ao sacarídeo pode ser caracterizado como uma faixa de

lisinas conjugadas, que pode ser expressa como uma razão molar. Por exemplo, em uma composição imunogênica onde 4 a 15 resíduos de lisina de CRM₁₉₇ são covalentemente ligados ao sacarídeo, a razão molar entre lisinas conjugadas e CRM₁₉₇ no glicoconjugado está entre cerca de 10:1 e cerca de 40:1. Em uma composição imunogênica onde 2 a 20 resíduos de lisina de CRM₁₉₇ são covalentemente ligados ao sacarídeo, a razão molar entre lisinas conjugadas e CRM₁₉₇ no glicoconjugado está entre cerca de 5:1 e cerca de 50:1.

[061] Em uma modalidade, a razão molar entre lisinas conjugadas e proteína carreadora é de cerca de 10:1 a cerca de 25:1. Em algumas modalidades, a proteína carreadora é CRM₁₉₇.

[062] Em uma modalidade, a razão sacarídeo:proteína carreadora (p/p) está entre 0,2 e 4. Em outra modalidade, a razão sacarídeo:proteína carreadora (p/p) está entre 1,1 e 1,7. Em algumas modalidades, o sacarídeo é um polissacarídeo capsular bacteriano, e a razão sacarídeo:proteína carreadora (p/p) está entre 0,2 e 4. Em outras modalidades, o sacarídeo é um polissacarídeo capsular bacteriano, e a razão sacarídeo:proteína carreadora (p/p) está entre 1,1 e 1,7. Em algumas modalidades, a proteína carreadora é CRM₁₉₇.

[063] A frequência de fixação da cadeia de sacarídeo a uma lisina na proteína carreadora é outro parâmetro que serve para caracterizar os glicoconjugados da revelação. Por exemplo, em uma modalidade, existe pelo menos uma ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo para cada 100 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em uma modalidade, existe pelo menos uma ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo para cada 50 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em uma modalidade, existe pelo menos uma ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo para cada 25 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em outra modalidade, a ligação

covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo ocorre pelo menos uma vez a cada 4 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em outra modalidade, a ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo ocorre pelo menos uma vez a cada 10 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em uma modalidade adicional, a ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo ocorre pelo menos uma vez a cada 15 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo.

[064] Em modalidades frequentes, a proteína carreadora é CRM₁₉₇ e a ligação covalente entre o CRM₁₉₇ e o polissacarídeo ocorre pelo menos uma vez a cada 4, 10, 15 ou 25 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em algumas modalidades, o polissacarídeo é um polissacarídeo capsular bacteriano, por exemplo, um polissacarídeo capsular derivado a partir de bactérias *S. pneumoniae* ou *N. meningitidis*.

[065] Em outras modalidades, o conjugado compreende pelo menos uma ligação covalente entre a proteína carreadora e o sacarídeo para cada 5 a 10 unidades de repetição de sacarídeo; cada 2 a 7 unidades de repetição de sacarídeo; cada 3 a 8 unidades de repetição de sacarídeo; cada 4 a 9 unidades de repetição de sacarídeo; cada 6 a 11 unidades de repetição de sacarídeo; cada 7 a 12 unidades de repetição de sacarídeo; cada 8 a 13 unidades de repetição de sacarídeo; cada 9 a 14 unidades de repetição de sacarídeo; cada 10 a 15 unidades de repetição de sacarídeo; cada 2 a 6 unidades de repetição de sacarídeo, cada 3 a 7 unidades de repetição de sacarídeo; cada 4 a 8 unidades de repetição de sacarídeo; cada 6 a 10 unidades de repetição de sacarídeo; cada 7 a 11 unidades de repetição de sacarídeo; cada 8 a 12 unidades de repetição de sacarídeo; cada 9 a 13 unidades de repetição de sacarídeo; cada 10 a 14 unidades de repetição de sacarídeo; cada 10

a 20 unidades de repetição de sacarídeo; ou cada 4 a 25 unidades de repetição de sacarídeo.

[066] Em outra modalidade, pelo menos uma ligação entre a proteína carreadora e o sacarídeo ocorre para cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo.

[067] Em uma modalidade, o glicoconjugado da revelação compreende pelo menos uma ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo para cada 25 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em outra modalidade, a ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo ocorre pelo menos uma vez a cada 4 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em outra modalidade, a ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo ocorre pelo menos uma vez a cada 10 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo. Em uma modalidade adicional, a ligação covalente entre a proteína carreadora e o polissacarídeo ocorre pelo menos uma vez a cada 15 unidades de repetição de sacarídeo do polissacarídeo.

[068] Em uma modalidade, o glicoconjugado compreende menos de cerca de 45% de sacarídeo livre comparado à quantidade total de sacarídeo. Em outra modalidade, o glicoconjugado compreende menos de cerca de 30% de sacarídeo livre comparado à quantidade total de sacarídeo. Em outra modalidade, o glicoconjugado compreende menos de cerca de 20% de sacarídeo livre comparado à quantidade total de sacarídeo. Em uma modalidade adicional, o glicoconjugado compreende menos de cerca de 10% de sacarídeo livre comparado à quantidade total de sacarídeo. Em outra modalidade, o glicoconjugado compreende menos de cerca de 5% de sacarídeo livre comparado à quantidade total de sacarídeo.

[069] Em outra modalidade, o glicoconjugado compreende menos

de cerca de 20 mole % de resíduos de proteína carreadora comparado à quantidade total de glicoconjugado.

[070] Em outro aspecto, a revelação proporciona uma composição imunogênica que compreende um glicoconjugado da revelação e pelo menos um entre um adjuvante, diluente ou carreador.

[071] Em uma modalidade, a revelação proporciona uma composição imunogênica que compreende um glicoconjugado da revelação e pelo menos um entre o adjuvante, diluente ou carreador, em que o glicoconjugado compreende um polissacarídeo capsular bacteriano covalentemente conjugado a uma proteína carreadora. Em algumas modalidades, o polissacarídeo capsular é derivado a partir de *S. pneumoniae* ou *N. meningitidis*.

[072] Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um adjuvante. Em algumas modalidades, o adjuvante é um adjuvante à base de alumínio selecionado a partir do grupo que consiste em fosfato de alumínio, sulfato de alumínio e hidróxido de alumínio. Em uma modalidade, a composição imunogênica compreende o adjuvante de fosfato de alumínio.

[073] Em algumas modalidades, os glicoconjugados ou composições imunogênicas da revelação podem ser usados para gerar anticorpos que sejam funcionais conforme medido exterminando-se bactérias em um modelo de eficácia animal ou através de um ensaio de extermínio opsonofagocítico.

[074] Em uma modalidade, a revelação proporciona um método para induzir uma resposta imune em um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade imunologicamente eficaz de uma composição imunogênica da revelação conforme descrito no presente documento. Em outro aspecto, a revelação proporciona um método para induzir uma resposta imune contra uma bactéria patogênica em um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo

uma quantidade imunologicamente eficaz de uma composição imunogênica conforme descrito no presente documento. Em outro aspecto, a revelação proporciona um método para prevenir ou aliviar uma doença ou condição causada por uma bactéria patogênica em um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade imunologicamente eficaz de uma composição imunogênica conforme descrito no presente documento. Em outro aspecto, a revelação proporciona um método para reduzir a gravidade de pelo menos um sintoma de uma doença ou condição causada por infecção com uma bactéria patogênica em um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade imunologicamente eficaz de uma composição imunogênica conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, a bactéria patogênica é *S. pneumoniae* ou *N. meningitidis*.

[075] Além disso, a presente revelação proporciona métodos para induzir uma resposta imune contra bactérias *S. pneumoniae* ou *N. meningitidis*, métodos para prevenir uma doença causada por bactérias *S. pneumoniae* ou *N. meningitidis*, e métodos para reduzir a gravidade de pelo menos um sintoma de uma doença causada por infecção com bactérias *S. pneumoniae* ou *N. meningitidis*.

SACARÍDEOS

[076] Os sacarídeos incluem polissacarídeos, oligossacarídeos e monossacarídeos. Em algumas modalidades, o sacarídeo é um polissacarídeo, em particular, um polissacarídeo capsular bacteriano.

[077] O peso molecular do polissacarídeo capsular é um fator para uso em composições imunogênicas. Polissacarídeos capsulares com alto peso molecular são capazes de induzir determinadas respostas imunes de anticorpo devido a uma valência maior dos epítomos presentes na superfície antigênica. O isolamento e a purificação de polissacarídeos capsulares com alto peso molecular são

contemplados para uso nos conjugados, composições e métodos da presente revelação.

[078] Em uma modalidade, o polissacarídeo capsular tem um peso molecular entre 10 kDa e 2.000 kDa. Em uma modalidade, o polissacarídeo capsular tem um peso molecular entre 50 kDa e 1.000 kDa. Em outra modalidade, o polissacarídeo capsular tem um peso molecular entre 50 kDa e 300 kDa. Em outra modalidade, o polissacarídeo capsular tem um peso molecular entre 70 kDa e 300 kDa. Em modalidades adicionais, o polissacarídeo capsular tem um peso molecular entre 90 kDa e 250 kDa; 90 kDa e 150 kDa; 90 kDa e 120 kDa; 80 kDa e 120 kDa; 70 kDa e 100 kDa; 70 kDa e 110 kDa; 70 kDa e 120 kDa; 70 kDa e 130 kDa; 70 kDa e 140 kDa; 70 kDa e 150 kDa; 70 kDa e 160 kDa; 80 kDa e 110 kDa; 80 kDa e 120 kDa; 80 kDa e 130 kDa; 80 kDa e 140 kDa; 80 kDa e 150 kDa; 80 kDa e 160 kDa; 90 kDa e 110 kDa; 90 kDa e 120 kDa; 90 kDa e 130 kDa; 90 kDa e 140 kDa; 90 kDa e 150 kDa; 90 kDa e 160 kDa; 100 kDa e 120 kDa; 100 kDa e 130 kDa; 100 kDa e 140 kDa; 100 kDa e 150 kDa; 100 kDa e 160 kDa; e faixas de peso molecular desejadas similares. Qualquer número inteiro dentro de qualquer uma das faixas anteriores é contemplado como uma modalidade da revelação.

[079] O polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae*, Serotipo 12F (Pn-serotipo 12F) tem a estrutura mostrada na Figura 1. O polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae*, Serotipo 10A (Pn-serotipo 10A) tem a estrutura mostrada na Figura 3. O polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae*, Serotipo 33F (Pn-serotipo 33F) tem a estrutura mostrada na Figura 4. O polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae*, Serotipo 3 (Pn-serotipo 3) tem a estrutura mostrada na Figura 5.

[080] Em algumas modalidades, os polissacarídeos capsulares, glicoconjugados ou composições imunogênicas da revelação são usados para gerar anticorpos que sejam funcionais conforme medidos

pelo extermínio de bactérias em um modelo de eficácia animal ou um ensaio de extermínio opsonofagocítico que demonstra que os anticorpos exterminam as bactérias. Os polissacarídeos capsulares podem ser obtidos diretamente a partir de bactérias usando procedimentos de isolamento conhecidos por indivíduos com conhecimento comum na técnica. Vide, por exemplo, Fournier *et al.* (1984), *supra*; Fournier *et al.* (1987) *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138:561-567; Publicação de Pedido de Patente N° U.S. 2007/0141077; e Publicação de Pedido de Patente Internacional N° WO 00/56357; estando cada um desses aqui incorporado a título de referência como se fossem apresentados em suas totalidades). Além disso, os mesmos podem ser produzidos usando protocolos sintéticos. Ademais, o polissacarídeo capsular pode ser recombinantemente produzido usando procedimentos de engenharia genética também conhecidos por um indivíduo com conhecimento comum na técnica (vide, Sau *et al.* (1997) *Microbiology* 143:2395-2405; e a Patente N° U.S. 6.027.925; estando cada um desses aqui incorporado a título de referência como se fossem apresentados em suas totalidades). Cepas de *S. pneumoniae* ou *N. meningitidis* podem ser usadas para produzir os respectivos polissacarídeos que são obtidos seja a partir de coleções de cultura estabelecidas ou a partir de espécimes clínicos.

PROTEÍNAS CARREADORAS

[081] Outro componente do glicoconjugado da revelação é uma proteína carreadora à qual o sacarídeo é conjugado. O termo “carreador protéico” ou “proteína carreadora” ou “carreador” se refere a qualquer molécula protéica que possa ser conjugada a um antígeno (tal como um polissacarídeo capsular) contra o qual uma resposta imune é desejada.

[082] A conjugação a um carreador pode acentuar a imunogenicidade do antígeno. Os carreadores protéicos para os

antígenos podem ser toxinas, toxóides ou qualquer material de reatividade cruzada (CRM) mutante da toxina do tétano, difteria, coqueluche, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Em uma modalidade, um carreador é proveniente do CRM₁₉₇ toxóide de difteria, derivado a partir da cepa de *C. diphtheriae* C7 (β197), que produz a proteína CRM₁₉₇. Essa cepa tem o número de acesso ATCC 53281. Descreve-se um método para produzir CRM₁₉₇ na Patente N° U.S. 5.614.382, estando cada um desses aqui incorporado a título de referência como se fossem apresentados em suas totalidades. Alternativamente, pode-se usar um fragmento ou epítipo do carreador protéico ou outra proteína imunogênica. Por exemplo, um antígeno haptênico pode ser acoplado a um epítipo de célula T de uma toxina bacteriana, toxóide ou CRM. Outras proteínas carreadoras adequadas incluem toxinas bacterianas inativadas, como toxóide cólera (por exemplo, conforme descrito no Pedido de Patente Internacional N° WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, e exotoxina A da *Pseudomonas aeruginosa*. Podem-se usar proteínas de membrana externa bacteriana, como complexo c de membrana externa (OMPC), porina, proteínas de aglutinação de transferrina, pneumolisina, proteína A de superfície pneumocócica (PspA), proteína de adesão pneumocócica (PsaA) ou proteína D *Haemophilus influenzae*. Outras proteínas, como ovalbumina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albumina sérica bovina (BSA) ou derivado protéico purificado de tuberculina (PPD) também podem ser usadas como proteínas carreadoras.

[083] Conforme discutido previamente no presente documento, o número de resíduos de lisina na proteína carreadora que se tornam conjugados ao sacarídeo pode ser caracterizado como uma faixa de lisinas conjugadas. Por exemplo, em uma dada composição imunogênica, o CRM₁₉₇ pode compreender de 1 a 15 resíduos de lisina dentre os 39 covalentemente ligados ao sacarídeo. Outra forma de

expressar esse parâmetro é que cerca de 2,5% a cerca de 40% das lisinas CRM₁₉₇ são covalentemente ligados ao sacarídeo. Por exemplo, em uma dada composição imunogênica, o CRM₁₉₇ pode compreender de 1 a 20 resíduos de lisina dentre os 39 covalentemente ligados ao sacarídeo. Outra forma de expressar esse parâmetro é que cerca de 2,5% a cerca de 50% de lisinas CRM₁₉₇ são covalentemente ligados ao sacarídeo.

MÉTODOS PARA PRODUZIR GLICOCONJUGADOS

[084] A fim de produzir um glicoconjugado, um polissacarídeo deve ser primeiramente ativado (isto é, quimicamente modificado) antes que possa ser quimicamente ligado a um carreador, tal como uma proteína. Antes da etapa de ativação, os sacarídeos podem ser hidrolisados ou mecanicamente dimensionados por homogeneização de pressão para alcançar pesos moleculares apropriados (por exemplo, 50 kDa a 500 kDa) para ativação e conjugação subsequente. A oxidação parcial de carboidratos em polissacarídeos foi efetivamente utilizada para gerar grupos aldeídos que são, então, acoplados a grupos amina, tais como os resíduos de lisina de proteínas carreadoras, para gerar conjugados imunogênicos. É importante que o método usado para conjugar um polissacarídeo a uma proteína carreadora resulte em uma ligação covalente estável, e as condições de reação são suaves o suficiente para manter a integridade estrutural dos componentes individuais. Os métodos comumente usados para ativar e acoplar polissacarídeos a proteínas carreadoras incluem química de amina redutiva (RAC), cianilação, e uso de carbodiimida. Tipicamente, a amina redutiva envolve o uso de periodato de sódio ou potássio ou ácido periódico a fim de oxidar seletivamente grupos -OH vicinais em grupos aldeídos ativos. A cianilação é usada para converter aleatoriamente grupos -OH em grupos -CN ativos. A carbodiimida é usada para ativar grupos carboxila

substituindo-se grupos -OH por carbodiimida.

[085] Química de aminação redutiva (RAC) consiste em um dos métodos mais comuns usados para acoplar polissacarídeos a proteínas visto que a reação entre o grupo carbonila resultante do polissacarídeo e o grupo amino da proteína carreadora podem formar uma base de Schiffs correspondente, que pode, então, ser seletivamente reduzida na presença de cianoboroidreto de sódio (NaCNBH_3) a uma ligação de carbono-nitrogênio saturável bastante estável. Adicionalmente, pode-se realizar aminação redutiva em uma solução aquosa sob condições suaves o suficiente para preservar a integridade estrutural dos componentes de sacarídeo e proteína. Após a conjugação, aldeídos não-reagidos podem, então, ser capeados através da redução de boroidreto de sódio (NaBH_4). O conjugado pode, então, ser purificado (por exemplo, por ultrafiltração/diafiltração), fornecendo um glicoconjugado a granel final em uma solução salina tamponada de succinato.

[086] No entanto, dependendo do polissacarídeo particular, o uso dos métodos comuns notados acima nem sempre proporciona resultados adequados. Por exemplo, a oxidação direta de polissacarídeos com periodato de sódio pode resultar na clivagem da cadeia principal de polissacarídeo.

[087] Por exemplo, observou-se que para os conjugados preparados usando condições de oxidação de periodato padrão (seguida por aminação redutiva), lotes representativos apresentaram um aumento em polissacarídeo livre e uma redução em peso molecular, a 25°C e superior. A presente revelação proporciona a constatação que o uso de um método de oxidação à base de sal de N-oxoamônio resultou em uma estabilidade aperfeiçoada de vários conjugados de polissacarídeo de *S. pneumoniae*, particularmente, Serotipo 12F. Em particular, conforme mostrado em maiores detalhes

nos Exemplos 1 a 7, 2,2,6,6,-Tetrametil-1-piperidinilóxi (TEMPO) de radical livre foi usado em combinação com N-clorossuccinimida (NCS) para oxidar efetivamente os grupos de hidroxila primários de Serotipos 12F, 10A, 3 e 33F a fim de aperfeiçoar a estabilidade dos conjugados resultantes. Muito embora a oxidação seletiva de álcoois primários em aldeídos usando TEMPO/NCS tenha sido mostrada no contexto de reações químicas orgânicas usando moléculas pequenas em solventes orgânicos (vide, por exemplo, Einhorn et al., *J. Org. Chem.* 61, pp. 7452-7454 (1996)), a presente revelação proporciona a constatação inovadora que TEMPO/NCS podem ser usados como um agente de oxidação para oxidar seletivamente polissacarídeos complexos em solução aquosa a fim de produzir conjugados protéicos de polissacarídeo estável.

[088] De modo correspondente, em uma modalidade, a presente revelação proporciona métodos para produzir glicoconjugados que compreendam um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora, que compreendem as etapas de: a) reagir um sacarídeo com um composto de radical estável de nitroxila e um oxidante para produzir um sacarídeo ativado; e b) reagir o sacarídeo ativado com uma proteína carreadora que compreende um ou mais grupos amina.

[089] Em um aspecto, os grupos aldeídos não-reagidos são convertidos de volta em álcoois primários durante uma etapa de capeamento, usando boroidreto, após conjugação com a proteína carreadora, minimizando, assim, a modificação de epítipo de sacarídeo durante as etapas de modificação que envolvem oxidação seguida por conjugação

[090] Em um aspecto, a etapa a) da reação é realizada em solvente aquoso. Em outro aspecto, a etapa a) é realizada em solvente aprótico. Em um aspecto, a etapa a) é realizada em um solvente de DMSO (dimetil sulfóxido), Dimetilacetamida (DMA), Sulfolano, N-Metil-

2-pirrolidona (NMP), Hexametilfosforamida (HMPA) ou em DMF (dimetilformamida).

[091] Em um aspecto, os ditos compostos de radical estável de nitroxila são compostos de piperidina-N-óxi ou pirrolidina-N-óxi. De preferência, os ditos compostos têm a capacidade de oxidar seletivamente álcoois primários na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem afetar os grupos hidroxila secundários. Com mais preferência, os ditos compostos têm a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem sobre-oxidação em grupos carboxila. Em uma modalidade, o dito composto de radical estável de nitroxila é uma molécula portando uma porção de TEMPO ou uma porção de PROXIL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinilóxi). De preferência, a dita molécula tem a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem afetar os grupos de hidroxila secundários. Com mais preferência, a dita molécula tem a capacidade de oxidar seletivamente álcoois primários na presença de um oxidante, para gerar grupos aldeídos, sem sobre-oxidação em grupos carboxila. Em um aspecto, o dito composto de radical estável de nitroxila é TEMPO ou um derivado do mesmo. Em uma modalidade, o dito composto de radical estável de nitroxila é selecionado a partir dos grupos que consistem em TEMPO, 2,2,6,6-Tetrametil-4-(metil sulfonilóxi)-1-piperidinoxil, 4-Fosfonooxi-TEMPO, 4-Oxo-TEMPO, 4-Metóxi-TEMPO, 4-Isotiocianato-TEMPO, radical livre de 4-(2-Iodoacetamido)-TEMPO, 4-Hidróxi-TEMPO, 4-Ciano-TEMPO, 4-Carbóxi-TEMPO, 4-(2-Bromoacetamido)-TEMPO, 4-Amino-TEMPO, 4-Acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil. De preferência, o dito composto de radical estável de nitroxila é TEMPO. Em uma modalidade adicional, o dito composto de radical estável de nitroxila é selecionado a partir dos grupos que consistem em 3 β -DOXIL-5 α -colestano, ácido 5-

DOXIL-esteárico, ácido 16-DOXIL-esteárico, Metil 5-DOXIL-estearato, 3-(Aminometil)-PROXIL, 3-Carbamoil-PROXIL, 3-Carbamoil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-1-oxil, 3-Carbóxi-PROXIL, 3-Ciano-PROXIL. Em uma modalidade, o dito oxidante é uma molécula portando uma porção N-halo. De preferência, a dita molécula tem a capacidade de oxidar seletivamente álcool primário na presença de um composto de radical nitroxila. Em uma modalidade, o dito oxidante é selecionado a partir do grupo que consiste em N-Clorossuccinimida, N-Bromossuccinimida, N-Iodossuccinimida, ácido Dicloroisocianúrico, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona, ácido Dibromoisocianúrico, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona, ácido Diiodoisocianúrico e 1,3,5-triiodo-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona. De preferência, o dito oxidante é N-Clorossuccinimida.

[092] Em um aspecto, o sacarídeo é reagido com 0,1 a 10 equivalentes molares de oxidante. De preferência, o sacarídeo é reagido com 0,2 a 5, 0,5 a 2,5 ou 0,5 a 1,5 equivalentes molares de oxidante. Em um aspecto, o polissacarídeo é reagido com cerca de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 ou 5 equivalentes molares de oxidante.

[093] Em um aspecto, o composto de radical estável de nitroxila está presente em uma quantidade catalítica. Em um aspecto, o sacarídeo é reagido com menos de cerca de 0,3 equivalente molar de composto de radical estável de nitroxila. Em um aspecto, o sacarídeo é reagido com menos de cerca de 0,005 equivalente molar de composto de radical estável de nitroxila. Em um aspecto, o sacarídeo é reagido com cerca de 0,005, 0,01, 0,05 ou 0,1 equivalente molar de composto de radical estável de nitroxila.

[094] Em uma modalidade, a presente revelação proporciona métodos para produzir glicoconjugados que compreendem um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora, que compreendem

as etapas de: a) reagir um sacarídeo com 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilóxi (TEMPO) e N-clorossuccinimida (NCS) em um solvente aquoso para produzir um sacarídeo ativado; e b) reagir o sacarídeo ativado com uma proteína carreadora que compreende um ou mais grupos amina.

[095] Em outras modalidades, o método compreende, ainda, uma etapa de purificar o glicoconjugado, por exemplo, por diafiltração.

[096] Em cada caso, o sacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em um polissacarídeo, um oligossacarídeo e um monossacarídeo.

[097] Em cada caso, o dito sacarídeo pode ser purificado a partir do meio de fermentação ou sinteticamente derivado.

[098] Em modalidades frequentes, a proteína carreadora é CRM₁₉₇. Em uma modalidade, o polissacarídeo capsular bacteriano é um polissacarídeo capsular derivado a partir de *S. pneumoniae*. Em outra modalidade preferencial, o polissacarídeo capsular bacteriano é um polissacarídeo capsular derivado a partir de *N. meningitidis*.

[099] Em uma modalidade, o método para produzir um glicoconjugado da revelação compreende a etapa de isolar o conjugado de sacarídeo-proteína carreadora após o mesmo ser produzido. Em modalidades frequentes, o glicoconjugado é isolado por ultrafiltração.

[0100] Em uma modalidade, a proteína carreadora usada no método para produzir um conjugado isolado de polissacarídeo capsular-proteína carreadora de *S. pneumoniae* compreende CRM₁₉₇. Em uma modalidade, a proteína carreadora usada no método para produzir um conjugado isolado de polissacarídeo capsular-proteína carreadora de *N. meningitidis* compreende CRM₁₉₇.

[0101] Em uma modalidade, o CRM₁₉₇ é reagido com o polissacarídeo ativado em uma razão em peso de cerca de 1:1.

[0102] Em uma modalidade, o método para produzir um conjugado isolado de polissacarídeo capsular:proteína carreadora de *S. pneumoniae* compreende a etapa de capear a mistura de reação de conjugado de polissacarídeo-proteína carreadora para remover grupos de ativação não-reagidos.

[0103] Em uma modalidade, o CRM₁₉₇ no método para produzir um conjugado de polissacarídeo capsular-CRM₁₉₇ é adicionado em uma razão em peso de cerca de 0,4:1 de CRM₁₉₇:molécula de polissacarídeo capsular. Em outras modalidades, a razão em peso de CRM₁₉₇:polissacarídeo capsular é cerca de 0,5:1, cerca de 0,6:1, cerca de 0,7:1, cerca de 0,8:1, cerca de 0,9:1, cerca de 1:1, cerca de 1,1:1, cerca de 1,2:1, cerca de 1,3:1, cerca de 1,4:1, ou cerca de 1,5:1.

[0104] Em uma modalidade, o sacarídeo usado no método para produzir o glicoconjugado da revelação tem um peso molecular entre cerca de 10 kDa e cerca de 2.000 kDa. Em outras modalidades, o peso molecular está entre cerca de 50 kDa e cerca de 1.000 kDa, entre cerca de 50 kDa e cerca de 20.000 kDa, entre cerca de 200 kDa e cerca de 10.000 kDa, entre cerca de 1.000 kDa e cerca de 3.000 kDa.

[0105] Em outro aspecto, a revelação proporciona uma composição imunogênica que compreende um glicoconjugado produzido através de qualquer um dos métodos descritos no presente documento.

[0106] Em outro aspecto, a revelação proporciona uma composição imunogênica que compreende um glicoconjugado obtenível através de qualquer um dos métodos descritos no presente documento.

COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS

[0107] O termo “composição imunogênica” se refere a qualquer composição farmacêutica contendo um antígeno, por exemplo, um

microorganismo ou um componente do mesmo, sendo que essa composição pode ser usada para provocar uma resposta imune em um indivíduo.

[0108] Conforme o uso em questão, “imunogênico(a)” significa uma capacidade de um antígeno (ou um epítipo do antígeno), tal como um polissacarídeo capsular bacteriano, ou um glicoconjugado ou composição imunogênica que compreende o antígeno, para provocar uma resposta imune em um hospedeiro, tal como um mamífero, mediado humoral ou celularmente, ou ambos.

[0109] De modo correspondente, um “glicoconjugado” ou “conjugado” conforme o uso em questão significa qualquer glicoconjugado contendo um antígeno ou determinante antigênico (isto é, epítipo) de um conjugado de polissacarídeo capsular bacteriano a uma molécula carreadora que pode ser usada para provocar uma resposta imune.

[0110] O glicoconjugado pode servir para sensibilizar o hospedeiro pela apresentação do antígeno em associação às moléculas de MHC em uma superfície celular. Além disso, células T antígeno-específica ou anticorpos podem ser gerados para permitir uma proteção futura de um hospedeiro imunizado. Logo, os glicoconjugados podem proteger o hospedeiro contra um ou mais sintomas associados com uma infecção pelas bactérias, ou podem proteger o hospedeiro contra morte devido à infecção com as bactérias associadas ao polissacarídeo capsular. Os glicoconjugados também podem ser usados para gerar anticorpos policlonais ou monoclonais, que podem ser usados para conferir imunidade passiva a um indivíduo. Os glicoconjugados também pode ser usados para gerar anticorpos que sejam funcionais conforme medido exterminando-se bactérias em um modelo de eficácia animal ou através de um ensaio de extermínio opsonofagocítico.

[0111] Um “anticorpo” é uma molécula de imunoglobulina capaz de

aglutinação específica a um alvo, tal como um carboidrato, polinucleotídeo, lipídeo, polipeptídeo, etc., através de pelo menos um sítio de reconhecimento de antígeno, localizado na região variável da molécula de imunoglobulina. Conforme o uso em questão, exceto onde indicado em contrário pelo contexto, o termo é destinado a abranger não somente anticorpos policlonais ou monoclonais intactos, mas também anticorpos modificados por engenharia (por exemplo, quiméricos, humanizados e/ou derivados para alterar funções efectoras, estabilidade e outras atividades biológicas) e fragmentos desses (como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticorpos de cadeia única (ScFv) e domínio, incluindo anticorpos de tubarão e camelídeos), e proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos desde que exibam a atividade biológica desejada) e fragmentos de anticorpo conforme descrito no presente documento, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreenda um sítio de reconhecimento de antígeno. Um anticorpo inclui um anticorpo de qualquer classe, como IgG, IgA, ou IgM (ou subclasses desses), e o anticorpo não precisa ser de qualquer classe particular. Dependendo da sequência de aminoácido de anticorpo do domínio constante de suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias dessas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 em seres humanos. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem a diferentes classes de imunoglobulinas são denominados como alfa, delta, épsilon, gama, e mu, respectivamente. Estruturas subunitárias e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são notórias.

[0112] “Fragmentos de anticorpo” compreendem somente uma porção de um anticorpo intacto, em que a porção retém preferencialmente pelo menos uma, de preferência, a maioria ou todas as funções normalmente associadas a essa porção quando presente em um anticorpo intacto.

[0113] O termo “antígeno” se refere, em geral, a uma molécula biológica, geralmente uma proteína, peptídeo, polissacarídeo ou conjugado em uma composição imunogênica, ou substância imunogênica que possa estimular a produção de anticorpos ou respostas de célula T, ou ambas, em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas em um animal. A resposta imune pode ser gerada à molécula toda, ou a várias porções da molécula (por exemplo, um epítopo ou hapteno). O termo pode ser usado para se referir a uma molécula individual ou a uma população homogênea ou heterogênea de moléculas antigênicas. Um antígeno é reconhecido por anticorpos, receptores de célula T ou outros elementos de imunidade humoral e/ou celular específica. “Antígeno” também inclui todos os epítomos antigênicos relacionados. Epítomos de um dado antígeno podem ser identificados usando qualquer número de técnicas de mapeamento de epítopo, notórias na técnica. Vide, por exemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J. Por exemplo, epítomos lineares podem ser determinados, por exemplo, sintetizando-se simultaneamente grandes números de peptídeos em suportes sólidos, sendo que os peptídeos correspondem a porções da molécula protéica, e reagindo-se os peptídeos com anticorpos enquanto os peptídeos ainda estiverem fixados aos suportes. Essas técnicas são conhecidas na técnica e descritas, por exemplo, na Patente N° U.S. 4.708.871; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715;

estando cada um desses aqui incorporado a título de referência como se fossem apresentados em suas totalidades. De modo similar, epítomos conformacionais podem ser identificados determinando-se conformação espacial de aminoácidos, como, por exemplo, através de cristalografia de raios x e ressonância magnética nuclear bidimensional. Vide, por exemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*.

[0114] Adicionalmente, pelos propósitos da presente revelação, “antígeno” também pode ser usado para se referir a uma proteína que inclui modificações, tais como deleções, adições e substituições (geralmente conservativas na natureza, mas podem ser não-conservativas), à sequência nativa, desde que a proteína mantenha a capacidade de provocar uma resposta imunológica. Essas modificações podem ser deliberadas, conforme através de mutagênese sítio-direcionada, ou através de procedimentos sintéticos particulares, ou através de uma abordagem de engenharia genética, ou podem ser acidentais, tal com através de mutações de hospedeiros, que produzem os antígenos. Adicionalmente, o antígeno pode ser derivado, obtido, ou isolado a partir de um micróbio, por exemplo, uma bactéria, ou pode ser um organismo inteiro. De modo similar, um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo, que expressam um antígeno, tal como em aplicações de imunização de ácido nucléico, também está incluído na definição. Antígenos sintéticos também podem ser incluídos, por exemplo, poliepítomos, epítomos de flanqueamento, e outros antígenos recombinantes ou sinteticamente derivados (Bergmann *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777 2781; Bergmann *et al.* (1996) *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier (1997) *Immunol. Cell Biol.* 75:402 408; Gardner *et al.* (1998) 12^a Conferência Mundial de AIDS, Genebra, Suíça, de 28 de junho a 3 de julho de 1998).

[0115] Uma resposta imune “protetora” se refere à capacidade de uma composição imunogênica em provocar uma resposta imune, seja

humoral ou medicada por célula, ou ambas, que serve para proteger um indivíduo contra uma infecção. A proteção fornecida não precisa ser absoluta, isto é, a infecção não precisa ser totalmente prevenida ou erradicada. Se existir um aperfeiçoamento estatisticamente significativo comparado a uma população de controle de indivíduos, por exemplo, animais infectados não administrados com vacina ou composição imunogênica. A proteção pode ser limitada a mitigar a gravidade ou rapidez do princípio dos sintomas da infecção. Em geral, uma “resposta imune protetora” incluiria a indução de um aumento nos níveis de anticorpo específicos para um antígeno particular em pelo menos 50% de indivíduos, incluindo certo nível de respostas de anticorpo funcional mensuráveis a cada antígeno. Em situações particulares, uma “resposta imune protetora” poderia incluir a indução de um aumento dobrado nos níveis de anticorpo ou um aumento quadruplicado nos níveis de anticorpo específicos para um antígeno particular em pelo menos 50% dos indivíduos, incluindo certo nível de resposta de anticorpo funcional mensuráveis a cada antígeno. Em determinadas modalidades, a opsonização de anticorpos se correlaciona a uma resposta imune protetora. Logo, uma resposta imune protetora pode ser ensaiada medindo-se a redução percentual na contagem bacteriana em um ensaio de opsonofagocitose, por exemplo, aqueles descritos abaixo. De preferência, existe uma redução na contagem bacteriana de pelo menos 10%, 25%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais. A “quantidade imunogênica” de um conjugado particular em uma composição é genericamente dosada com base no polissacarídeo total, conjugado e não-conjugado para tal conjugado. Por exemplo, um conjugado de polissacarídeo capsular com 20% de polissacarídeo livre terá cerca de 80 mcg de polissacarídeo conjugado e cerca de 20 mcg de polissacarídeo não-conjugado em uma dose de 100 mcg. A contribuição protéica ao

conjugado geralmente não é considerada ao calcular a dose de um conjugado. Em geral, cada dose compreenderá 0,1 a 100 mcg de polissacarídeo, particularmente, 0,1 a 10 mcg, e, mais particularmente, 1 a 10 mcg.

[0116] Uma modalidade da revelação proporciona uma composição imunogênica que compreende qualquer um dos glicoconjugados que compreende um polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* conjugado a uma proteína carreadora descrita acima.

[0117] As composições imunogênicas da presente revelação podem ser usadas para proteger ou tratar um ser humano suscetível à infecção bacteriana, por exemplo, por uma bactéria *S. pneumoniae* ou por uma bactéria *N. meningitidis*, através da administração de composições imunogênicas via uma rota sistêmica, dérmica ou mucosal, ou podem ser usadas para gerar uma preparação de anticorpo policlonal ou monoclonal que poderia ser usada para conferir imunidade passiva em outro indivíduo. Essas administrações podem incluir injeção através das rotas intramusculares, intraperitoneais, intradérmicas ou subcutâneas; ou através de administração mucosal aos tratos oral/alimentar, respiratório ou genitourinário. As composições imunogênicas também podem ser usadas para gerar anticorpos que sejam funcionais conforme medido pelo extermínio de bactérias em um modelo de eficácia animal ou através de um ensaio de extermínio opsonofagocítico.

[0118] Quantidades ótimas de componentes para uma composição imunogênica particular podem ser confirmadas por estudos padrão que envolve, a observação de respostas imunes apropriadas em indivíduos. Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber uma ou várias imunizações de reforço adequadamente espaçadas.

[0119] Em uma modalidade, as composições imunogênicas da revelação compreendem, ainda, pelo menos um entre um adjuvante,

um tampão, um crioprotetor, um sal, um cátion divalente, um detergente não-iônico, um inibidor de oxidação de radical livre, um diluente ou um carreador. Em uma modalidade, o adjuvante na composição imunogênica da revelação é um adjuvante à base de alumínio. Em uma modalidade, o adjuvante é um adjuvante à base de alumínio selecionado a partir do grupo que consiste em fosfato de alumínio, sulfato de alumínio e hidróxido de alumínio. Em uma modalidade, o adjuvante é fosfato de alumínio.

[0120] Um adjuvante é uma substância que acentua a resposta imune quando administrado junto a um imunógeno ou antígeno. Uma série de citocinas ou linfocinas mostrou ter uma atividade de modulação imune, e, logo, pode ser útil de modo igual ou similar a adjuvantes, incluindo, sem limitação, a interleucinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (vide, *por exemplo*, Patente N° U.S. 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 e 18 (e suas formas mutantes); os interferões- α , β e γ ; fator de estímulo de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF) (vide, *por exemplo*, Patente N° U.S. 5.078.996 e Número de Acesso ATCC 39900); fator de estímulo de colônias de macrófagos (M-CSF); fator de estímulo de colônias de granulócitos (G-CSF); e os fatores de necrose tumoral α e β . Ainda outros adjuvantes que são úteis com as composições imunogênicas descritas no presente documento incluem quimiocinas, incluindo, sem limitação, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , e RANTES; moléculas de adesão, como uma selectina, *por exemplo*, L-selectina, P-selectina e E-selectina; moléculas tipo mucina, *por exemplo*, CD34, GlyCAM-1 e MadCAM-1; um membro da família de integrina, como LFA-1, VLA-1, Mac-1 e p150.95; um membro da superfamília de imunoglobulinas, como PECAM, ICAMs, *por exemplo*, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 e LFA-3; moléculas co-estimulantes, como B7-1, B7-2, CD40 e CD40L; fatores de crescimento incluindo fator de crescimento vascular, fator de crescimento nervoso, fator de

crescimento de fibroblasto, fator de crescimento epidérmico, PDGF, BL-1, e fator de crescimento endotelial vascular; moléculas receptoras incluindo Fas, receptor TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, e DR6; e Caspases, incluindo ICE.

[0121] Adjuvantes adequados usados para acentuar uma resposta imune podem incluir, ainda, sem limitação, MPL™ (lipídeo A monofosforil 3-O-deacilado, Corixa; Hamilton, MT, EUA), que é descrito na Patente N° U.S. 4.912.094. Também são adequados para uso como adjuvantes os análogos de lipídeo A sintéticos ou compostos de fosfato de aminoalquila glucosamina (AGP), ou derivados ou análogos desses, que se encontram disponíveis junto a Corixa, e aqueles que são descritos na Patente No U.S. 6.113.918. Um AGP é 2-[(R)-3-Tetradecanoilóxi tetradecanoilamino] etil 2-Deóxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoióxi tetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoilóxi tetradecanoil-amino]-b-D-glicopiranosida, que também é conhecido como 529 (previamente conhecido como RC529). Esse adjuvante 529 é formulado como uma forma aquosa (AF) ou uma emulsão estável (SE).

[0122] Ainda outros adjuvantes incluem peptídeos de muramil, como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidróxi fosforilóxi)-etilamina (MTP-PE); emulsões óleo em água, como MF59 (Patente N° U.S. 6.299.884) (contendo Esqualeno a 5%, polissorbato 80 a 0,5%, e Span 85 a 0,5% (contendo opcionalmente várias quantidades de MTP-PE) formulado em partículas submicrônicas usando um microfluidizador, como um microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA, EUA)), e SAF (contendo Esqualeno a 10%, polissorbato 80 a 0,4%, polímero plurônico-bloqueado L121 a 5%, e thr-MDP, seja microfluidizado em uma emulsão submicrônica ou misturado por

vórtice para gerar uma emulsão com tamanho de partícula maior); adjuvante incompleto de Freund (IFA); sais de alumínio (alum), como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio; Anfigênio; Avridina; L121/equaleno; D-lactida-polilactida/glicosida; polióis plurônicos; *Bordetella* exterminada; saponinas, como STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA, EUA), descrito na Patente N° U.S. 5.057.540, ISCOMATRIX™ (CSL Limited, Parkville, Austrália), descrito na Patente N° U.S. 5.254.339, e complexos imunoestimulantes (ISCOMS); *Mycobacterium tuberculosis*; lipopolissacarídeos bacterianos; polinucleotídeos sintéticos, como oligonucleotídeos contendo um motivo CpG (por exemplo, Patente N° U.S. 6.207.646); IC-31 (Intercell AG, Viena, Áustria), descrito nas Patentes N°s EP 1.296.713 e EP 1.326.634; uma toxina da coqueluche (PT) ou mutante dessa, uma toxina de cólera ou mutante da mesma (por exemplo, Patentes N°s U.S. 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 e 7.384.640); ou uma toxina termo-lábil de *E. coli* (LT) ou mutante dessa, particularmente, LT-K63, LT-R72 (por exemplo, Patentes N°s U.S. 6.149.919, U.S. 7.115.730 e U.S. 7.291.588).

[0123] Opcionalmente, a composição imunogênica pode compreender um carreador farmacêuticamente aceitável. Os carreadores farmacêuticamente aceitáveis incluem carreadores aprovados por uma agência reguladora de um governo federal ou estadual, ou outra agência reguladora, ou arrolada na Farmacopeia Norte-Americana ou em outra farmacopeia genericamente reconhecida para uso em animais, incluindo seres humanos bem como mamíferos não-humanos. O termo carreador pode ser usado para se referir a um diluente, adjuvante, excipiente, ou veículo com o qual a composição farmacêutica é administrada. Água, soluções salinas e soluções aquosas de dextrose e glicerol podem ser empregadas como carreadores líquidos, particularmente para soluções injetáveis.

Exemplos de carreadores farmacêuticos adequados são descritos em “Remington's Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin. A formulação deve se adaptar ao modo de administração.

[0124] As composições imunogênicas da presente revelação podem compreender, ainda, um ou mais imunomoduladores adicionais, que são agentes que perturbam ou alteram o sistema imune, de modo que se observe uma regulação ascendente ou uma regulação descendente de imunidade humoral e/ou mediada por célula. Em uma modalidade, proporciona-se a regulação ascendente dos braços humorais e/ou mediados por célula do sistema imune.

[0125] Exemplos de determinados imunomoduladores incluem, por exemplo, um adjuvante ou citocina, ou ISCOMATRIX™ (CSL Limited; Parkville, Austrália), descrito na Patente Nº U.S. 5.254.339 dentre outros. Exemplos não-limitantes de adjuvantes que podem ser usados na composição imunogênica da presente revelação incluem o sistema de adjuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT, EUA), alum, géis minerais, como gel de hidróxido de alumínio, emulsões óleo em água, emulsões água em óleo, como, por exemplo, adjuvantes completos e incompletos de Freund, copolímero de bloco (CytRx; Atlanta, GA, EUA), QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA, EUA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA, EUA), AMPHIGEN™ adjuvante, saponina, Quil A ou outra fração de saponina, lipídeo A monofosforil, e avridina (N,N-Dioctadecil-N',N'-bis(2-hidróxi etil)-1,3-diaminopropano, adjuvante de lipídeo-amina N,N-Dioctadecil-N',N'-bis(2-hidróxi etil)propanodiamina). Exemplos não-limitantes de emulsões óleo em água úteis na composição imunogênica da revelação incluem formulações SEAM62 e SEAM 1/2 modificadas. SEAM62 modificado é uma emulsão óleo em água contendo esqualeno a 5% (v/v) (Sigma), detergente SPAN™ 85 a 1% (v/v) (ICI Surfactants), detergente polissorbato 80 a 0,7% (v/v) (ICI Surfactants), etanol a 2,5% (v/v), 200

mcg/mL de Quil A, 100 mcg/ml de colesterol, e lecitina a 0,5% (v/v). SEAM 1/2 modificado é uma emulsão óleo em água que compreende esqualeno a 5% (v/v), detergente SPAN™ 85 a 1% (v/v), detergente polissorbato 80 a 0,7% (v/v), etanol a 2,5% (v/v), 100 mcg/ml de Quil A, e 50 mcg/ml de colesterol. Outros imunomoduladores que podem ser incluídos na composição imunogênica incluem, por exemplo, uma ou mais interleucinas, interferões, ou outras citocinas ou quimiocinas conhecidas. Em uma modalidade, o adjuvante pode ser um derivado de ciclodextrina ou um polímero polianiónico, como aquele descrito nas Patentes N^{os} U.S. 6.165.995 e U.S. 6.610.310, respectivamente. Deve-se compreender que o imunomodulador e/ou adjuvante a serem usados dependerão do indivíduo ao qual a composição imunogênica será administrada, a rota de injeção e o número de injeções a serem aplicadas.

[0126] As composições imunogênicas da revelação podem compreender, ainda, um ou mais preservativos além de uma pluralidade de conjugados protéicos de polissacarídeo capsular. O FDA requer que os produtos biológicos em frascos de múltiplas doses (multi-dose) contenham um preservativo, com somente algumas exceções. Os produtos de vacina contendo preservativos incluem vacinas contendo cloreto de benzetônio (anthrax), 2-fenóxi etanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (Pneumo, Tifóide (parenteral), Varíola) e timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Gripe, JE, Meningite, Pneumonia, Raiva). Preservativos aprovados para uso em fármacos injetáveis incluem, por exemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenóxi etanol, cloreto de benzetônio, cloreto de benzalcônio, ácido benzoico, álcool benzílico, fenol, timerosal e nitrato fenil mercúrico.

EMBALAGEM E FORMAS DE DOSAGEM

[0127] As formulações da revelação podem compreender, ainda,

um ou mais entre um tampão, um sal, um cátion divalente, um detergente não-iônico, um crioprotetor, como um açúcar, e um antioxidante, como um sequestrante de radical livre ou agente quelante, ou qualquer combinação múltipla desses. A escolha de qualquer componente, por exemplo, um quelato, pode determinar se outro componente (por exemplo, um sequestrante) é ou não desejável. A composição final formulada para administração deve ser estéril e/ou livre de pirogênio. Os indivíduos versados na técnica podem determinar empiricamente que combinações desses e outros componentes serão ótimas para inclusão nas composições imunogênicas contendo preservativo da revelação dependendo de uma variedade de fatores como as condições particulares de armazenamento e administração exigidas.

[0128] Em determinadas modalidades, uma formulação da revelação que seja compatível à administração parenteral compreende um ou mais tampões fisiologicamente aceitáveis selecionados, sem limitação, a partir de Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina e succinato. Em determinadas modalidades, a formulação é tamponada em uma faixa de pH de cerca de 6,0 a cerca de 9,0, de preferência, de cerca de 6,4 a cerca de 7,4.

[0129] Em determinadas modalidades, pode ser desejável ajustar o pH da composição imunogênica ou formulação da revelação. O pH de uma formulação da revelação pode ser ajustado usando técnicas padrão na arte. O pH da formulação pode ser ajustado entre 3,0 e 8,0. Em determinadas modalidades, o pH da formulação pode ser igual ou pode ser ajustado para que esteja entre 3,0 e 6,0, 4,0 e 6,0, ou 5,0 e 8,0. Em outras modalidades, o pH da formulação pode ser igual ou pode ser ajustado para que seja cerca de 3,0, cerca de 3,5, cerca de 4,0, cerca de 4,5, cerca de 5,0, cerca de 5,5, cerca de 5,8, cerca de 6,0, cerca de 6,5, cerca de 7,0, cerca de 7,5, ou cerca de 8,0. Em

determinadas modalidades, o pH pode ser igual ou pode ser ajustado para que esteja em uma faixa de 4,5 a 7,5, ou de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 5,4, de 5,4 a 5,5, de 5,5 a 5,6, de 5,6 a 5,7, de 5,7 a 5,8, de 5,8 a 5,9, de 5,9 a 6,0, de 6,0 a 6,1, de 6,1 a 6,2, de 6,2 a 6,3, de 6,3 a 6,5, de 6,5 a 7,0, de 7,0 a 7,5 ou de 7,5 a 8,0. Em uma modalidade específica, o pH da formulação é cerca de 5,8.

[0130] Em determinadas modalidades, uma formulação da revelação que seja compatível à administração parenteral compreende um ou mais cátions divalentes, incluindo, sem limitação, MgCl_2 , CaCl_2 e MnCl_2 , em uma concentração variando de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, com até cerca de 5 mM sendo preferencial.

[0131] Em determinadas modalidades, uma formulação da revelação que seja compatível à administração parenteral compreende um ou mais sais, incluindo, sem limitação, cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de sódio, e sulfato de potássio, presentes em uma resistência iônica que seja fisiologicamente aceitável ao indivíduo mediante a administração parenteral e incluídos em uma concentração final para produzir uma resistência iônica selecionada ou osmolaridade na formulação final. A resistência iônica ou osmolalidade final da formulação serão determinadas por múltiplos componentes (por exemplo, íons de composto(s) de tamponamento e outros sais de não-tamponamento. Um sal preferencial, NaCl , está presente de uma faixa de até cerca de 250 mM, com concentrações salinas sendo selecionadas para complementar outros componentes (por exemplo, açúcares) de modo que a osmolaridade total final da formulação seja compatível à administração parenteral (por exemplo, injeção intramuscular ou subcutânea) e promoverá uma estabilidade a longo prazo dos componentes imunogênicos da composição imunogênica formulação em várias faixas de temperatura. Formulações livres de sal irão tolerar faixas aumentadas de um ou mais crioprotetores

selecionados para manter níveis de osmolaridade final desejados.

[0132] Em determinadas modalidades, uma formulação da revelação que seja compatível à administração parenteral compreende um ou mais crioprotetores selecionados, sem limitação, a partir de dissacarídeos (por exemplo, lactose, maltose, sacarose ou trealose) e hidrocarbonetos de poliidróxi (por exemplo, dulcitol, glicerol, manitol e sorbitol).

[0133] Em determinadas modalidades, a osmolaridade da formulação se encontra em uma faixa de cerca de 200 mOs/L a cerca de 800 mOs/L, com uma faixa preferencial de cerca de 250 mOs/L a cerca de 500 mOs/L, ou cerca de 300 mOs/L a cerca de 400 mOs/L. Uma formulação livre de sal pode conter, por exemplo, de cerca de 5% a cerca de 25% de sacarose, e, de preferência, de cerca de 7% a cerca de 15%, ou cerca de 10% a cerca de 12% de sacarose. Alternativamente, uma formulação livre de sal pode conter, por exemplo, de cerca de 3% a cerca de 12% de sorbitol, e, de preferência, de cerca de 4% a 7%, ou cerca de 5% a cerca de 6% de sorbitol. Se um sal como cloreto de sódio for adicionado, então, a faixa eficaz de sacarose ou sorbitol é relativamente reduzida. Essas e outras considerações de osmolalidade e osmolaridade são notórias na técnica.

[0134] Em determinadas modalidades, uma formulação da revelação que seja compatível à administração parenteral compreende um ou mais inibidores de oxidação de radical livre e/ou agentes quelantes. Uma variedade de sequestrantes de radical livre e quelatos é conhecida na técnica e se aplicam às formulações e métodos de uso descritos no presente documento. Exemplos incluem, mas não se limitam a, etanol, EDTA, uma combinação de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sódio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido

succínico/succinato, ácido málico/maleato, desferal, EDDHA e DTPA, e várias combinações de dois ou mais dentre os supracitados. Em determinadas modalidades, pelo menos um sequestrante de radical livre não-redutor pode ser adicionado em uma concentração que acentue efetivamente a estabilidade a longo prazo da formulação. Um ou mais inibidores de oxidação de radical livre/quelatos também podem ser adicionados em várias combinações, como um sequestrante e um cátion divalente. A escolha do quelato determinará se a adição de um sequestrante é ou não necessária.

[0135] Em determinadas modalidades, uma formulação da revelação que seja compatível à administração parenteral compreende um ou mais tensoativos não-iônicos, incluindo, sem limitação, ésteres de ácido graxo de polioxietileno sorbitano, polissorbato-80 (TWEEN™ 80), polissorbato-60 (TWEEN™ 60), polissorbato-40 (TWEEN™ 40) e polissorbato-20 (TWEEN™ 20), ésteres de polióxido etileno alquil, incluindo, sem limitação, Brij 58, Brij 35, bem como outros TRITON™ X-100; TRITON™ X-114, NP40 (nonil fenóxi polietóxido etanol), SPAN™ 85 e a série PLURONIC™ de tensoativos não-iônicos (por exemplo, PLURONIC™ 121), com componentes preferenciais de polissorbato-80 em uma concentração de cerca de 0,001% a cerca de 2% (até cerca de 0,25% sendo preferencial) ou polissorbato-40 em uma concentração de cerca de 0,001% a 1% (até cerca de 0,5% sendo preferencial).

[0136] Em determinadas modalidades, uma formulação da revelação compreende um ou mais agentes de estabilização adicionais adequados para administração parenteral, por exemplo, um agente de redução que compreende pelo menos um grupo tiol (-SH) (por exemplo, cisteína, N-acetil cisteína, glutathione reduzida, tioglicolato de sódio, tiosulfato, monotioglicerol, ou misturas desses). Alternativa ou opcionalmente, as formulações de composição imunogênica contendo

preservativo da revelação podem ser adicionalmente estabilizadas removendo-se oxigênio dos recipientes de armazenamento, protegendo-se a formulação da luz (por exemplo, usando recipientes de vidro âmbar).

[0137] As formulações de composição imunogênica contendo preservativo da revelação podem compreender um ou mais carreadores ou excipientes farmacologicamente aceitáveis, que incluem qualquer excipiente que não induza uma resposta imune. Excipientes adequados incluem, mas não se limitam a, macromoléculas, como proteínas, sacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, sacarose (Paoletti et al, 2001, *Vaccine*, 19:2118), trealose, lactose e agregados lipídicos (como gotículas de óleo ou lipossomas). Esses carreadores são notórios aos indivíduos versados na técnica. Excipientes farmacologicamente aceitáveis são discutidos, por exemplo, em Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edição, ISBN:0683306472.

[0138] As composições da revelação podem ser liofilizadas ou sob a forma aquosa, isto é, soluções ou suspensões. As formulações líquidas podem ser vantajosamente administradas diretamente a partir de sua forma embalada e, logo, são ideais para injeção sem a necessidade de reconstrução em meio aquoso conforme, de outro modo, necessário para composições liofilizadas da revelação.

[0139] A distribuição direta de composições imunogênicas da presente a um indivíduo pode ser realizada por administração parenteral (intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea, intravenosa, ou ao espaço intersticial de um tecido); ou por administração retal, oral, vaginal, topical, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar ou outra administração mucosal. Em uma modalidade preferencial, a administração parenteral ocorre por injeção

intramuscular, por exemplo, na coxa ou braço do indivíduo. A injeção pode ocorrer através de uma agulha (por exemplo, uma agulha hipodérmica), porém, alternativamente, pode-se usar uma injeção livre de agulha. Uma dose intramuscular típica é de 0,5 mL. As composições da revelação podem ser preparadas em várias formas, por exemplo, para injeção como soluções ou suspensões líquidas. Em determinadas modalidades, a composição pode ser preparada como um pó ou aspersão para administração pulmonar, por exemplo, em um inalador. Em outras modalidades, a composição pode ser preparada como um supositório ou pessário, ou para administração nasal, aural ou ocular, por exemplo, como uma aspersão, gotas, gel ou pó. Quantidades ótimas de componentes para uma composição imunogênica particular podem ser confirmadas por estudos padrão que envolvem a observação de respostas imunes apropriadas em indivíduos. Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber uma ou várias imunizações de reforço adequadamente espaçadas.

[0140] As composições imunogênicas da revelação podem ser embaladas em dose única ou em uma forma de múltiplas doses (por exemplo, 2 doses, 4 doses, ou mais). Para formas de múltiplas doses, os frascos são tipicamente, mas não necessariamente, preferenciais em relação a seringas pré-carregadas. Os formatos de múltiplas doses adequados incluem, mas não se limitam a: 2 a 10 doses por recipiente em 0,1 a 2 mL por dose. Em determinadas modalidades, a dose é uma dose de 0,5 mL. Vide, por exemplo, o Pedido de Patente Internacional WO2007/127668, que se encontra aqui incorporado a título de referência.

[0141] As composições podem ser apresentadas em frascos ou em outros recipientes de armazenamento adequados, ou podem ser apresentadas em dispositivos de distribuição pré-carregados, por exemplo, seringas de componente único ou múltiplos componentes,

que podem ser equipadas ou não com agulhas. Tipicamente, mas não necessariamente, uma seringa contém uma dose única da composição imunogênica contendo preservativo da revelação, embora seringas de múltiplas doses pré-carregadas também sejam consideradas. De modo similar, um frasco pode incluir uma dose única, mas pode incluir alternativamente doses múltiplas.

[0142] Volumes de dosagem eficazes podem ser rotineiramente estabelecidos, mas uma dose típica da composição para injeção tem um volume de 0,5 mL. Em determinadas modalidades, a dose é formulada para administração a um indivíduo humano. Em determinadas modalidades, a dose é formulada para administração a um indivíduo humano adulto, jovem, adolescente, criança ou bebê (isto é, menor que 1 ano de idade) e pode, em modalidades preferenciais, ser administrada por injeção.

[0143] Composições imunogênicas líquidas da revelação também são adequadas para reconstituir outras composições imunogênicas que estejam presentes sob a forma liofilizada. Quando uma composição imunogênica precisar ser usada para essa reconstituição extemporânea, a revelação proporciona um kit com dois ou mais frascos, duas ou mais seringas pronto-carregadas, ou um ou mais de cada, com os conteúdos da seringa sendo usados para reconstituir os conteúdos do frasco antes da injeção, ou vice-versa.

[0144] Alternativamente, as composições imunogênicas da presente revelação podem ser liofilizadas e reconstituídas, por exemplo, usando um ou vários métodos para secagem por congelamento notórios na técnica para formar partículas secas com formato regular (por exemplo, esféricas), tais como micropelotas ou microesferas, tendo características de partícula, como tamanhos de diâmetro médio que possam ser selecionados e controlados variando-se os métodos exatos usados para prepará-los. As composições

imunogênicas podem compreender, ainda, um adjuvante que pode ser opcionalmente preparado ou contido em partículas separadas secas com formato regular (por exemplo, esféricas), como micropelotas ou microesferas. Nessas modalidades, a presente revelação proporciona, ainda, um kit de composição imunogênica que compreende um primeiro componente que inclua uma composição imunogênica seca estabilizada, compreendendo opcionalmente, ainda, um ou mais preservativos da revelação, e um segundo componente que compreende uma solução aquosa estéril para reconstituição do primeiro componente. Em determinadas modalidades, a solução aquosa compreende um ou mais preservativos, e pode compreender opcionalmente pelo menos um adjuvante (vide, por exemplo, WO2009/109550 (aqui incorporado a título de referência)).

[0145] Ainda em outra modalidade, um recipiente do formato de múltiplas doses é selecionado a partir de um ou mais entre o grupo que consiste, sem limitação, em frascos de vidro laboratoriais genéricos, béqueres, cilindros graduados, fermentadores, biorreatores, tubagens, tubos, bolsas, jarros, conceptáculos, tampas para conceptáculos (por exemplo, uma rolha de borracha, uma rosca na tampa), ampolas, seringas, seringas de câmara dupla ou múltipla, rolhas de seringa, êmbolos de seringa, tampas de borracha, tampas de plástico, tampas de vidro, cartuchos e caneta descartáveis, e similares. O recipiente da presente revelação não se limita pelo material de manufatura, e inclui materiais como vidro, metais (por exemplo, aço, aço inoxidável, alumínio, etc.) e polímeros (por exemplo, termoplásticos, elastômeros, elastômeros termoplásticos). Em uma modalidade particular, o recipiente do formato é um conceptáculo de vidro Schott Tipo 1 de 5 mL com uma rolha de butila. Os artesãos versados avaliarão que o formato apresentado acima não consiste de forma alguma a uma lista exaustiva, mas serve meramente como

diretriz ao artesanato em relação à variedade de formatos disponíveis para a presente revelação. Formatos adicionais contemplados para uso na presente revelação podem ser encontrados em catálogos publicados de vendedores e fabricantes de equipamentos laboratoriais, como United States Plastic Corp. (Lima, OH, EUA), VWR.

MÉTODOS PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE E PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO

[0146] A presente revelação também inclui métodos de uso para composições imunogênicas descritas no presente documento. Por exemplo, uma modalidade da revelação proporciona um método para induzir uma resposta imune contra uma bactéria patogênica, por exemplo, *S. pneumonia*, que compreende administrar a um indivíduo uma quantidade imunogênica de qualquer uma das composições imunogênicas descritas no presente documento que compreendem um antígeno bacteriano, como um polissacarídeo capsular bacteriano derivado a partir da bactéria patogênica. Uma modalidade da revelação proporciona um método para proteger um indivíduo contra uma infecção por *S. pneumoniae*, ou um método para prevenir infecção por *S. pneumoniae*, ou um método para reduzir a gravidade ou retardo do princípio de pelo menos um sintoma associado a uma infecção causada por *S. pneumoniae*, sendo que os métodos compreendem administrar a um indivíduo uma quantidade imunogênica de qualquer uma das composições imunogênicas descritas no presente documento que compreendem um antígeno bacteriano, como um polissacarídeo capsular bacteriano derivado a partir de *S. pneumoniae*. Uma modalidade da revelação proporciona um método para tratar ou prevenir uma infecção por Streptococcal, doença ou condição associada a um *Streptococcus sp.* em um indivíduo, sendo que o método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de uma

composição imunogênica descrita no presente documento ao indivíduo. Em algumas modalidades, o método para tratar ou prevenir uma infecção por Streptococcal, doença ou condições compreende tratamento humano, veterinário, animal, ou agrícola. Outra modalidade proporciona um método para tratar ou prevenir uma infecção por Streptococcal, doença ou condição associada a um *Streptococcus sp.* em um indivíduo, sendo que o método compreende gerar uma preparação de anticorpo policlonal ou monoclonal a partir da composição imunogênica descrita no presente documento, e usar a dita preparação de anticorpo para conferir imunidade passiva ao indivíduo. Uma modalidade da revelação proporciona um método para prevenir uma infecção por Streptococcal em um indivíduo passando por um procedimento cirúrgico, sendo que o método compreende a etapa de administrar uma quantidade profilaticamente eficaz de uma composição imunogênica descrita no presente documento ao indivíduo antes do procedimento cirúrgico.

[0147] Uma “resposta imune” a um antígeno ou composição imunogênica é o desenvolvimento em um indivíduo de uma resposta imune humoral e/ou mediada por célula a moléculas presentes no antígeno ou composição de vacina de interesse. Pelos propósitos da presente revelação, uma “resposta imune humoral” é uma resposta imune mediada por anticorpos e envolve a indução e a geração de anticorpos que reconheçam e se aglutina com alguma afinidade pelo antígeno na composição imunogênica da revelação, enquanto uma “resposta imune mediada por célula” é aquela mediada por células T e/ou outros glóbulos brancos. Uma “resposta imune mediada por célula” é provocada pela apresentação de epítomos antigênicos em associação a moléculas de Classe I ou Classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), CD1 ou outras moléculas tipo MHC não-clássicas. Isso ativa as células T CD4+ auxiliares antígeno-

específicas ou células de linfócito Y CD8+ citotóxico (“CTLs”). CTLs têm especificidade por antígenos peptídicos que sejam apresentados em associação a problemas codificados por MHCs clássicos ou não-clássicos e expressos nas superfícies das células. CTLs ajudam a induzir e promover a destruição intracelular de micróbios intracelulares, ou a lise de células infectadas com esses micróbios. Outro aspecto de imunidade celular envolve uma resposta antígeno-específica pelas células T auxiliares. As células T auxiliares agem para ajudar a estimular a função, e o foco de atividade de células efectoras não-específicas contra células que exibem peptídeo ou outros antígenos em associação a moléculas MHC clássicas ou não-clássicas em sua superfície. Uma “resposta imune mediada por célula” também se refere à produção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas produzidas por células T ativadas e/ou outros glóbulos brancos, incluindo aqueles derivados a partir de células CD4+ células T CD8+. A capacidade de um antígeno particular ou composição em estimular uma resposta imunológica mediada por célula pode ser determinada por uma série de ensaios, como por ensaios de linfoproliferação (ativação de linfócito), ensaios de célula citotóxica CTL, pelo ensaio para linfócitos T específicos para o antígeno em um indivíduo sensibilizado, ou pela medição da produção de citocina por células T em resposta ao re-estímulo com antígeno. Esses ensaios são notórios na técnica. Vide, por exemplo, Erickson *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:4189-4199; e Doe *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2369-2376.

[0148] Conforme o uso em questão, “tratamento” (incluindo variações desse, por exemplo, “tratar” ou “tratado(a)”) significa qualquer um ou mais do seguinte: (i) a prevenção de infecção ou reinfecção, conforme em uma vacina tradicional, (ii) a redução na gravidade, ou, a eliminação de sintomas, e (iii) a eliminação substancial ou completa do patógeno ou distúrbio em questão.

Portanto, o tratamento pode ser realizado profilaticamente (antes da infecção) ou terapeuticamente (após a infecção). Na presente revelação, o tratamento profilático é o modo preferencial. De acordo com uma modalidade particular da presente revelação, proporcionam-se composições e métodos que tratem, incluindo imunizar profilaticamente e/ou terapeuticamente, um animal hospedeiro contra uma infecção microbiana (por exemplo, uma bactéria como *Streptococcus*). Os métodos da presente revelação são úteis para conferir imunidade profilática e/ou terapêutica a um indivíduo. Os métodos da presente revelação também podem ser praticados em indivíduos para aplicações de pesquisa biomédica.

[0149] Conforme o uso em questão, “mamífero” significa um animal humano ou não-humano. Mais particularmente, mamífero se refere a qualquer animal classificado como mamífero, inclusive seres humanos, animais domésticos e de fazenda, e animais de pesquisa, zoológico, esportes e domésticos, como um animal de estimação e outros animais domesticados incluindo, sem limitação, gado, carneiros, furões, porcos, cavalos, coelhos, cabras, cães, gatos, e similares. Os animais de estimação preferenciais são cães e gatos. De preferência, o mamífero é um ser humano.

[0150] Uma “quantidade imunogênica,” e uma “quantidade imunologicamente eficaz,” sendo ambas usadas de modo intercambiável no presente documento, se referem a uma quantidade de antígeno ou composição imunogênica suficiente para provocar uma resposta imune, seja uma resposta celular (célula T) ou humoral (célula B ou anticorpo), ou ambas, conforme medido por ensaios padrão conhecidos por um indivíduo versado na técnica.

[0151] A quantidade de um conjugado particular em uma composição é genericamente calculada com base no polissacarídeo total, conjugado e não-conjugado para tal conjugado. Por exemplo, um

conjugado com 20% de polissacarídeo livre terá cerca de 80 mcg de polissacarídeo conjugado e cerca de 20 mcg de polissacarídeo não-conjugado em uma dose de polissacarídeo de 100 mcg. A contribuição protéica ao conjugado geralmente não é considerada ao calcular a dose de um conjugado. A quantidade de conjugado pode variar dependendo do serotipo estreptocócico. Em geral, cada dose compreenderá 0,1 a 100 mcg de polissacarídeo, particularmente, 0,1 a 10 mcg, e, mais particularmente, 1 a 10 mcg. A “quantidade imunogênica” dos diferentes componentes de polissacarídeo na composição imunogênica, pode divergir e cada uma pode compreender 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, ou cerca de 100 mcg de qualquer antígeno de polissacarídeo particular.

[0152] Uma “doença invasiva” de *S. pneumoniae* é o isolamento de bactérias a partir de um sítio normalmente estéril, onde existem sinais/sintomas clínicos associados da doença. Sítios de corpo normalmente estéreis incluem sangue, CSF, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido de articulações/sinovial, osso, sítio de corpo interno (linfonodo, cérebro, coração, fígado, baço, fluido vítreo, rim, pâncreas, ovário) ou outros sítios normalmente estéreis. As condições clínicas que caracterizam doenças invasivas incluem bacteremia, pneumonia, celulite, osteomielite, endocardite, choque séptico, e similares.

[0153] A eficácia de um antígeno como um imunógeno pode ser medida seja por ensaios de proliferação, por ensaios citolíticos, como ensaios de liberação de cromo para medir a capacidade de uma célula T em lisar sua célula alvo específica, ou medindo-se os níveis de atividade de célula B medindo-se os níveis de anticorpos de circulação específicos para o antígeno no soro. Uma resposta imune também

pode ser detectada medindo-se os níveis séricos de anticorpo antígeno-específico induzido após a administração do antígeno, e, de modo mais específico, medindo-se a capacidade de os anticorpos assim induzidos acentuarem a capacidade opsonofagocítica de glóbulos brancos particulares, conforme descrito no presente documento. O nível de proteção da resposta imune pode ser medido desafiando-se o hospedeiro imunizado com o antígeno que foi administrado. Por exemplo, se o antígeno ao qual uma resposta imune é desejada for uma bactéria, o nível de proteção induzido pela quantidade imunogênica do antígeno é medida detectando-se a sobrevivência percentual ou a mortalidade percentual após o desafio dos animais com as células bacterianas. Em uma modalidade, uma quantidade de proteção pode ser medida medindo-se pelo menos um sintoma associado à infecção bacteriana, por exemplo, uma febre associada à infecção. A quantidade de cada um dos antígenos na vacina de multi-antígeno ou multi-componente ou composições imunogênicas irá variar em relação a cada um dos outros componentes e pode ser determinada por métodos conhecidos pelos indivíduos versados. Esses métodos incluiriam procedimentos para medir a imunogenicidade e/ou a eficácia *in vivo*. Em determinadas modalidades, o termo “cerca de” significa dentro de 20%, de preferência, dentro de 10%, e, com mais preferência, dentro de 5% do valor ou faixa indicada.

[0154] A revelação proporciona, ainda, anticorpos e composições de anticorpo que se aglutinam específica e seletivamente aos polissacarídeos capsulares ou glicoconjugados da presente revelação. Em algumas modalidades, os anticorpos são gerados mediante a administração a um indivíduo dos polissacarídeos capsulares ou glicoconjugados da presente revelação. Em algumas modalidades, a revelação proporciona anticorpos purificados ou isolados direcionados

contra um ou mais dos polissacarídeos capsulares ou glicoconjugados da presente revelação. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente revelação são funcionais conforme medido exterminando-se bactérias em um modelo de eficácia animal ou através de um ensaio de extermínio opsonofagocítico. Em algumas modalidades, os anticorpos da revelação conferem imunidade passiva a um indivíduo. A presente revelação proporciona, ainda, moléculas de polinucleotídeo que codificam um anticorpo ou fragmento de anticorpo da revelação, e uma célula, linhagem celular (como células de hibridoma ou outras linhagens celulares modificadas por engenharia para produção recombinante de anticorpos) ou um animal transgênico que produza um anticorpo ou composição de anticorpo da revelação, usando técnicas notórias aos indivíduos versados na técnica.

[0155] Os anticorpos ou composições de anticorpo da revelação podem ser usados em um método para tratar ou prevenir uma infecção estafilocócica, doença ou condição associada a um *Streptococcus sp.* em um indivíduo, sendo que o método compreende gerar uma preparação de anticorpo policlonal ou monoclonal, e usando o dito anticorpo ou composição de anticorpo para conferir imunidade passiva ao indivíduo. Os anticorpos da revelação também podem ser úteis para métodos diagnósticos, por exemplo, detectar a presença ou quantificar os níveis de polissacarídeo capsular ou um glicoconjugado do mesmo.

[0156] Os exemplos a seguir são proporcionados a título de ilustração e sem caráter limitativo. Abreviações: PM = peso molecular; WFI = água para injeção; TEMPO = radical livre de 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidinilóxi; NCS = N-Clorossuccinimida.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Conjugação de Pn serotipo-12F usando TEMPO/NCS

[0157] A fim de aperfeiçoar a estabilidade de glicoconjugados de

serotipo 12F-CRM₁₉₇, exploraram-se químicas alternativas usando radical livre de 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidinilóxi (TEMPO) e N-Clorossuccinimida (NCS) como o co-oxidante para oxidar álcoois primários em grupos aldeídos. A análise GC/MS mostrou que os sítios de oxidação eram diferentes daqueles de oxidação mediada por periodato. No caso de oxidação TEMPO-NCS, α -D-Glcp e 2-Glcp foram oxidados, enquanto α -D-Galp foi o sítio principal de oxidação quando o periodato foi usado (vide a Figura 1). Conforme descrito em maiores detalhes, TEMPO foi usado em quantidades catalíticas ($\leq 0,1$ equivalente molar) e o grau de oxidação (DO) desejado foi alcançado variando-se as quantidades de NCS usadas. De modo subsequente, vários conjugados foram sintetizados e caracterizados. Em geral, a produção de glicoconjugados de serotipo 12F foi realizada em várias fases, da seguinte forma:

- [0158] 1) Hidrólise de polissacarídeo de serotipo 12 em pesos moleculares 50 a 500 kDa.
- [0159] 2) Ativação de polissacarídeo de serotipo 12F com TEMPO/NCS
- [0160] 3) Purificação do polissacarídeo ativado
- [0161] 4) Conjugação serotipo 12F ativado à proteína CRM₁₉₇
- [0162] 5) Purificação de conjugados de serotipo 12F - CRM.

Exemplo 2: Hidrólise e oxidação de serotipo 12F

[0163] A hidrólise dos polissacarídeos foi tipicamente realizada sob condições ácidas com aquecimento para obter um peso molecular médio na faixa desejada de 100 a 350 kDa. Descreve-se, abaixo, um experimento típico.

Hidrólise

[0164] A solução de polissacarídeo de serotipo 12F foi adicionada a um recipiente de reação encamisado. A esse, o volume requerido de ácido acético a 0,30 M e água para injeção (WFI) foram adicionados

para manter uma concentração de ácido acético a $\sim 0,1$ M. O pH da solução foi ajustado para $3,2 \pm 0,3$ usando NaOH a 1 N ou ácido acético glacial. A temperatura da mistura de reação foi aumentada para $70 \pm 5^\circ\text{C}$. A mistura de reação foi agitada a $70 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 90 a 120 minutos. A mistura de reação foi resfriada até $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e neutralizada (pH 7,0) adicionando-se uma solução de NaOH a 1 M. O polissacarídeo hidrolisado foi purificado por ultrafiltração/diafiltração contra WFI usando membranas de MWCO 30K. A solução foi filtrada através de um filtro $0,22 \mu\text{m}$ e armazenada a 2 a 8°C até a oxidação. O peso molecular do polissacarídeo hidrolisado foi analisado por SEC-MALLS para garantir que o peso molecular satisfaça a faixa alvo de 100 a 350 kDa.

Oxidação parcial

[0165] Em um experimento, o polissacarídeo de serotipo 12F foi mecanicamente dimensionado usando homogeneização de pressão usando um microfluidizador para reduzir o peso molecular para aproximadamente 100 a 500 kDa. O polissacarídeo dimensionado foi adicionado a um recipiente de reação em uma concentração de 4,0 mg/mL e misturado com tampão de bicarbonato/carbonato (tampão de NaHCO_3 a 0,5 M/ Na_2CO_3 a 0,05 M, pH 8,6) em uma razão de 1:1 v/v. À mistura agitada adicionou-se $\leq 0,1$ equivalente molar de TEMPO. A reação foi iniciada pela adição de 0,6 a 1,0 equivalente molar de NCS. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 2 horas, sendo que após esse período o polissacarídeo ativado foi purificado por diafiltração, com WFI usando uma membrana de ultrafiltração 30K. O polissacarídeo purificado foi coletado e o grau de oxidação (DO) determinado por medições quantitativas de aldeído (usando um ensaio de 3-metil-2-benotiazolinona hidrazona (MBTH)) e polissacarídeo (usando um ensaio de antrona).

[0166] Em outro experimento, o polissacarídeo de serotipo 12F foi

hidrolisado para reduzir o peso molecular a um peso molecular de aproximadamente 100 a 500 kDa. O polissacarídeo de serotipo 12F foi adicionado a um recipiente de reação e misturado com um tampão de NaHCO_3 a 0,5 M/ Na_2CO_3 a 0,05 M (pH 8,6) em uma razão de 1:1 v/v. À mistura agitada adicionou-se 0,6 a 1,0 equivalente molar de NCS dissolvido em WFI. A ativação foi iniciada pela adição de aproximadamente 0,1 equivalente molar de TEMPO dissolvido em WFI. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 2 horas, sendo que após esse período o polissacarídeo ativado foi purificado por diafiltração com WFI usando uma membrana de ultrafiltração 30K. O polissacarídeo ativado purificado foi filtrado através de um filtro de 0,2 μm e armazenado a 4°C antes do uso.

[0167] As oxidações mediadas por TEMPO/NCS também foram realizadas com sucesso em tampões de fosfato de sódio de pH 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0. Em alguns experimentos de ativação um álcool primário, como n-propanol foi usado para arrefecer os reagentes a fim de evitar a sobre-oxidação do sacarídeo. Em outro conjunto de experimentos, o polissacarídeo quimicamente hidrolisado foi submetido à oxidação diretamente, sem a etapa de purificação por ultrafiltração/diafiltração.

Exemplo 3: Conjugação de polissacarídeo oxidado de serotipo 12F

[0168] Em um experimento, o polissacarídeo de serotipo 12F oxidado purificado foi adicionado a um recipiente de reação seguido pela adição de um tampão de fosfato de sódio a 0,5 M (pH 6,5) a uma concentração de tampão final de 0,1 M. A essa solução, CRM₁₉₇ previamente liofilizado foi adicionado e misturado vigorosamente a fim de obter uma solução homogênea. O pH foi ajustado para 6,8 usando uma solução diluída de HCl ou NaOH a 1N. Isso foi seguido pela adição de 1,5 equivalente molar de NaCNBH_3 . A mistura de reação foi agitada durante 24 horas em temperatura ambiente (23°C) e por 2,5 dias a 37°C. A mistura de reação foi, então, diluída com uma solução

salina 1X a 0,9% e os grupos aldeídos não-reagidos foram “capeados” com 2 equivalentes molares de boroidreto de sódio. O tempo de reação de capeamento foi de 3 horas.

[0169] Em outro experimento, o Serotipo 12F ativado purificado foi adicionado a um recipiente de reação seguido pela adição de tampão de fosfato de sódio a 0,5 M (pH 6,5) a uma concentração de tampão final de 0,1 M. A essa solução, CRM₁₉₇ previamente liofilizado foi adicionado e misturado vigorosamente para obter uma solução homogênea. O pH foi ajustado para 6,8 usando uma solução diluída de HCl ou NaOH a 1N. Isso foi seguido pela adição de 3 equivalentes molares de NaCNBH₃. A mistura de reação foi agitada por 24 horas a 23°C e por 48 horas a 37°C. A mistura de reação foi, então, diluída com uma solução salina 1X a 0,9% e com agitação, os grupos aldeídos não-reagidos foram “capeados” com 1 equivalente molar de boroidreto de sódio NaBH₄. O tempo de reação de capeamento foi de 3 horas.

[0170] Em outro experimento, o serotipo 12F ativado purificado foi adicionado a um recipiente de reação e misturado com uma solução de CRM₁₉₇. A mistura foi liofilizada e o pó dissolvido em um tampão de fosfato de sódio a 0,1 M (pH 6,8) a uma concentração de sacarídeo final de 5 mg/mL. Caso necessário, o pH foi ajustado para 6,8 usando uma solução diluída de HCl ou NaOH a 1N. Isso foi seguido pela adição de 3 equivalentes molares de NaCNBH₃. A mistura de reação foi agitada durante 24 horas a 23°C e durante 48 horas a 37°C. A mistura de reação foi, então, diluída com uma solução salina 1X a 0,9%, os grupos aldeídos não-reagidos foram “capeados” com 1 equivalente molar de boroidreto de sódio NaBH₄. O tempo de reação de capeamento foi e 3 horas.

Exemplo 4: Purificação de conjugado

[0171] A mistura de reação capeada foi filtrada usando um filtro de

5 µm e, então, purificada usando membranas de ultrafiltração MWCO 100K. O conjugado foi primeiramente diafiltrado usando um tampão de succinato a 10 mM/solução salina a 0,9 %, pH 6,0. O conjugado purificado foi, então, filtrado através de filtros de 0,45/0,22 µm para obter um conjugado a granel.

Exemplo 5: Grau de oxidação

[0172] Uma oxidação bem sucedida de álcoois primários no polissacarídeo de serotipo 12F foi alcançada usando o sistema TEMPO/NCS. Os polissacarídeos de serotipo 12F hidrolisados foram oxidados em graus variáveis de níveis de oxidação (DO) ajustando-se uma quantidade de co-oxidante NCS. O efeito em DO variando-se as quantidades de NCS usando diferentes lotes de polissacarídeo e pesos moleculares é mostrado na Figura 2. Tipicamente, 0,5 a 2,5 equivalentes molares de NCS foram usados para alcançar o grau de oxidação almejado. Tipicamente, a reação de oxidação é completa em 2 horas visto que nenhuma alteração significativa em DO foi observada após 2 horas.

[0173] Vários conjugados de serotipo 12F foram gerados e caracterizados usando o polissacarídeo oxidado TEMPO/NCS. Os resultados são resumidos na Tabela 1. Alguns conjugados representativos também foram gerados com sucesso usando outros serotipos pneumocócicos ativos com sistema TEMPO/NCS. O procedimento para a geração de conjugados para outros serotipos pneumocócicos foi o igual ao método usado para o Serotipo 12F. Os resultados são descritos nas Tabelas 2 a 4.

Tabela 1: Conjugados pneumocócicos de serotipo 12F-CRM₁₉₇

Lote de conjugado	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
Tempo de oxidação (h)	2	2	4	2	2	2

Lote de conjugado	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
Grau de oxidação (D.O)	12,0	6,0	9,6	12,0	11,5	11,5
% de rendimento de sacarídeo ativado	80	71	70	89	86	86
PM de sacarídeo ativado por MALLS (kDa)	137	155	170	190	240	240
Processo de conjugação	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Co-Lyo
Resultados de conjugado						
Rendimento de sacarídeo (%)	51,6	76,8	53,6	76,3	65,8	40,7
Razão entre sacarídeo/proteína	1,2	0,9	1,0	1,1	1,4	0,9
% de sacarídeo livre	24	10	17	20	23	14
Pm por SEC-MALLS (kDa)	2050	3000	3600	1500	2400	2100

Tabela 2: Conjugados pneumocócicos de serotipo 3-CRM₁₉₇

Lote de conjugado	Pn3-106-1	Pn3-106-4
Polissacarídeo MALLS (Pm) kDa	430	430
Oxidação		
Tempo de oxidação (h)	2	2
D.O.	9,4	15
% de rendimento de sacarídeo ativado	55	65
Pm de sacarídeo ativado por SEC-MALLS (kDa)	340	360
Conjugação		
Resultados de conjugado		

Rendimento de sacarídeo (%)	29,9	55,0
Razão entre sacarídeo e proteína	0,7	1,6
% de Sacarídeo livre	21,0	30,0
PM por SEC-MALLS (kDa)	2.100	2.600

Tabela 3: Conjugados pneumocócicos de serotipo 33F-CRM₁₉₇

Lote de conjugado	33F-#55	33F-#63
Polissacarídeo MALLS (Pm)	128 kDa	150 kDa
D.O.	20	5
Rendimento	92%	97%
Rendimento de sacarídeo (%)	44%	68%
Razão entre sacarídeo e proteína	0,54	0,68
Sacarídeo livre	<1%	1,10%
Proteína livre	<1%	<1%
Pm por SEC-MALLS (kDa)	11160 kDa	2730 kDa

Tabela 4: Conjugados pneumocócicos de serotipo 10A

Lote de conjugado	10A- #77	10A- #78	10A- #85	10A- #88	10A- #89	10A- #103	10A- #104
Polissacarídeo MALL (Pm)	538 Kda	538 Kda	538 Kda	538 Kda	538 Kda	509 Kda	509 Kda
D.O.	7,9	24	12	6,9	10	11,3	5,7
Rendimento	82%	90%	94%	88%	94%	94%	86%
Rendimento de sacarídeo (%)	35	20	42	35	41	43	36

Razão entre sacarídeo e proteína	0,53	0,33	0,73	0,7	0,95	0,6	0,45
Sacarídeo livre	<1	20	4,6	1,6	5,7	<1	<1
Proteína livre	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%
Pm por SEC-MALLS	3.168	16.390	4.117	3.137	2.855	4.380	3.772

Exemplo 6: Imunogenicidade de conjugados Pn-serotipo 12F-CRM197 usando o método de oxidação de TEMPO/NCS

[0174] Os títulos de atividade opsonofagocítica (OPA) para conjugados de serotipo 12F-CRM₁₉₇ em camundongos foram determinados em camundongos sob condições padrão. Os títulos de OPA (título de média geométrica (GMT) com um intervalo de confiança de 95% (IC)) em quatro e sete semanas são mostrados na Tabela 5, demonstrando que o conjugado de serotipo 12F-CRM₁₉₇ (Lote 12F-97B; vide também a Tabela 1 para dados de caracterização desse conjugado) provocou títulos de OPA em um modelo de imunogenicidade de murino. O conjugado gerado pelo TEMPO-NCS foi mais imunogênico que o conjugado de controle (171B) gerado a partir da oxidação de periodato.

Tabela 5: Imunogenicidade de conjugados de serotipo 12F-CRM197

Amostra/dose de conjugado	0,001 ug	0,01 ug	0,1 ug
Controle de oxidação de periodato (171B)	4	16	172
Oxidação de TEMPO/NCS (12F-97B)	40	417	880

Exemplo 7: Mecanismo putativo para o conjugado de Pn-serotipo 12F usando radical nitroxila na presença de um oxidante, como TEMPO/NCS

[0175] O mecanismo putativo de oxidação/conjugação de Pn-serotipo 12F é mostrado na Figura 6. Os grupos hidroxila primários do polissacarídeo são oxidados por quantidades catalíticas de radical

nitroxila, como TEMPO, com um oxidante, tal como NCS como o oxidante estequiométrico. O oxidante atual é o sal de N-oxoamônio, em um ciclo catalítico. A oxidação dos grupos hidroxila primária C-6 gera grupos aldeídos que são subsequentemente reagidos com os grupos amino primários da lisina da proteína carreadora (CRM₁₉₇) para gerar o glicoconjugado.

Exemplo 8: Comparação de estabilidade

[0176] A comparação da estabilidade da (a 25°C) dos conjugados gerados por oxidação de periodato vs oxidação de TEMPO/NCS (vide a Figura 7) demonstrou que o conjugado gerado pela oxidação dos polissacarídeos Pn-12F era relativamente mais estável. Conforme mostrado na Figura 7, um aumento no sacarídeo livre com o passar do tempo foi observado para o glicoconjugado gerado pela oxidação de periodato do polissacarídeo Pn-12F a 25°C. Em contrapartida, o glicoconjugado preparado usando a oxidação de TEMPO/NCS do polissacarídeo Pn-12F não mostrou tendências significativas para o sacarídeo livre sob condições similares.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um glicoconjugado que compreende um sacarídeo conjugado a uma proteína carreadora, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) reagir um sacarídeo, em que o referido sacarídeo é um polissacarídeo capsular bacteriano, com 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) e N-clorossuccinimida (NCS) em um solvente aquoso para produzir um sacarídeo ativado; e

b) reagir o sacarídeo ativado com uma proteína carreadora compreendendo um ou mais grupos amina.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é reagido com 0,1 a 10 equivalente molar de N-clorossuccinimida.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é reagido com 0,5 a 1,5 equivalente molar de N-clorossuccinimida.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilóxi (TEMPO) está presente em uma quantidade catalítica.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é reagido com menos de 0,3 equivalente molar de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO).

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o grau de oxidação do sacarídeo ativado varia de 3 a 40.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o grau de oxidação do sacarídeo ativado varia de 6 a 14.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo capsular é derivado de *S. pneumoniae*.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo capsular é selecionado de polissacarídeos capsulares de Pn-serotipo 3, Pn-serotipo 10A, Pn-serotipo 12F, e Pn-serotipo 33F.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo capsular é derivado a partir de *N. meningitidis*.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo capsular é selecionado a partir de polissacarídeos capsulares meningocócicos (Mn)-serotipo A, C, W135, e polissacarídeos capsulares Y.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo capsular é polissacarídeo capsular (Mn)-serotipo X.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a proteína carreadora é uma toxina do tétano, difteria, coqueluche, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus* ou *Streptococcus*.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a proteína carreadora é CRM₁₉₇.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que antes da etapa a) o sacarídeo é dimensionado.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que antes da etapa a) o sacarídeo é hidrolisado ou mecanicamente dimensionado.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que antes da etapa a) o sacarídeo é hidrolisado ou mecanicamente dimensionado por homogeneização de pressão para alcançar um peso molecular de 50 kDa a 500 kDa.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que antes da etapa a) o sacarídeo é hidrolisado a um peso molecular variando de 100 a 400 KDa.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que antes da etapa a) sacarídeo é hidrolisado , a um peso molecular variando de 150 a 350 KDa.

FIGURA 1

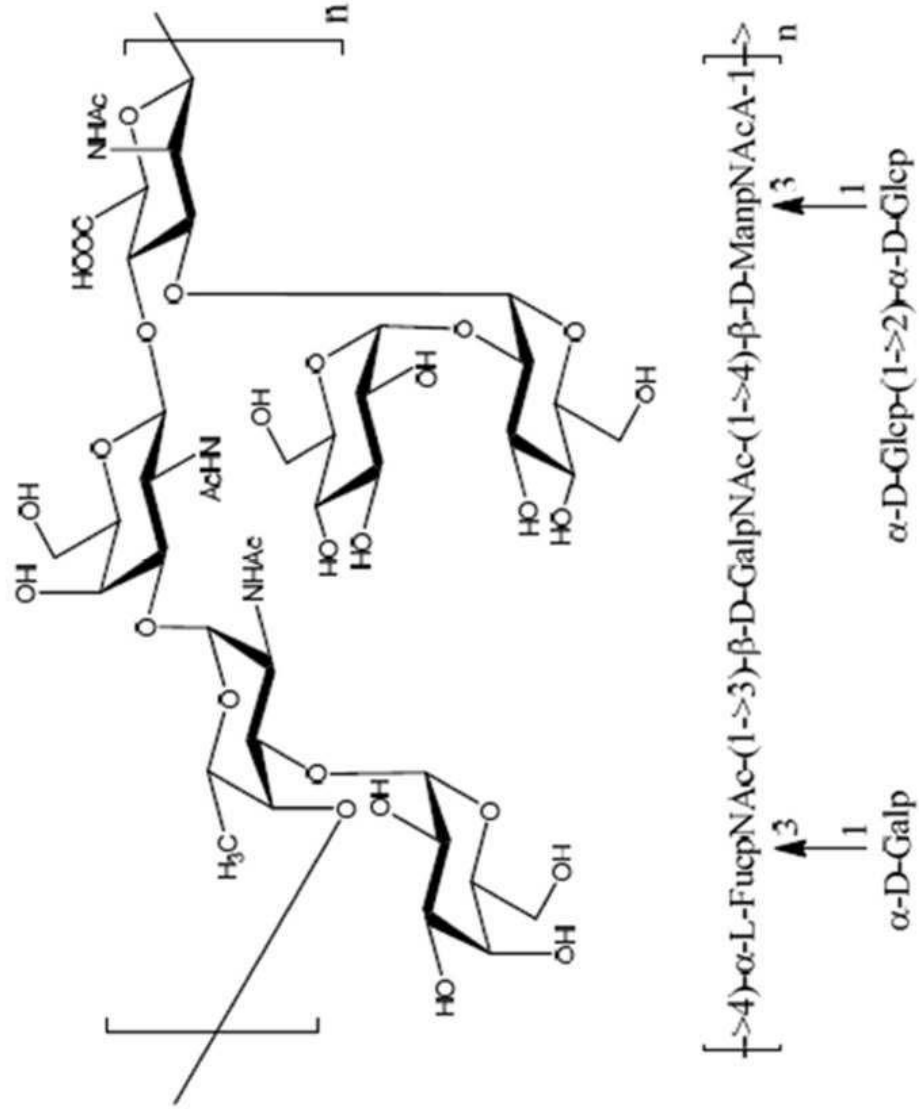


FIGURA 2

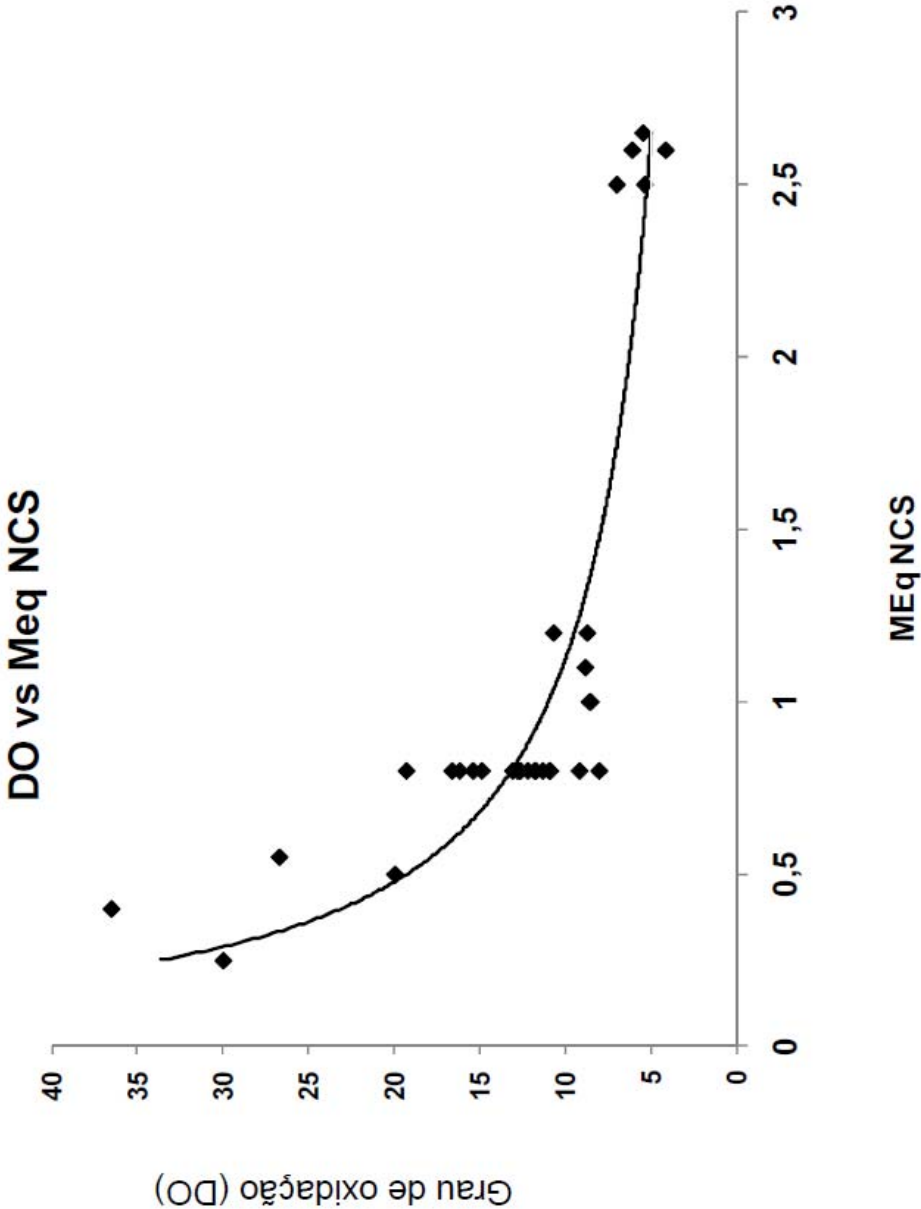


FIGURA 3

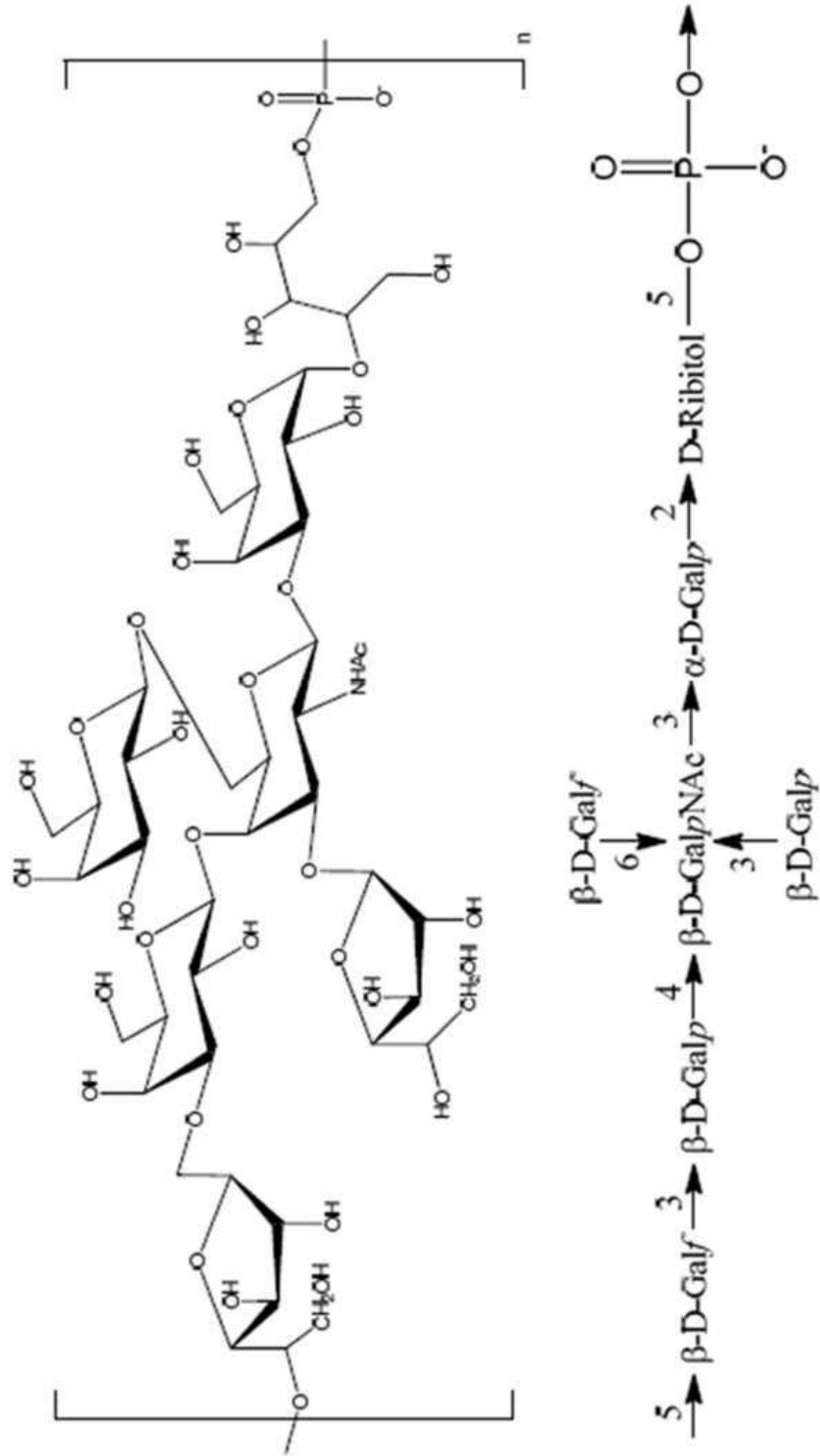


FIGURA 5

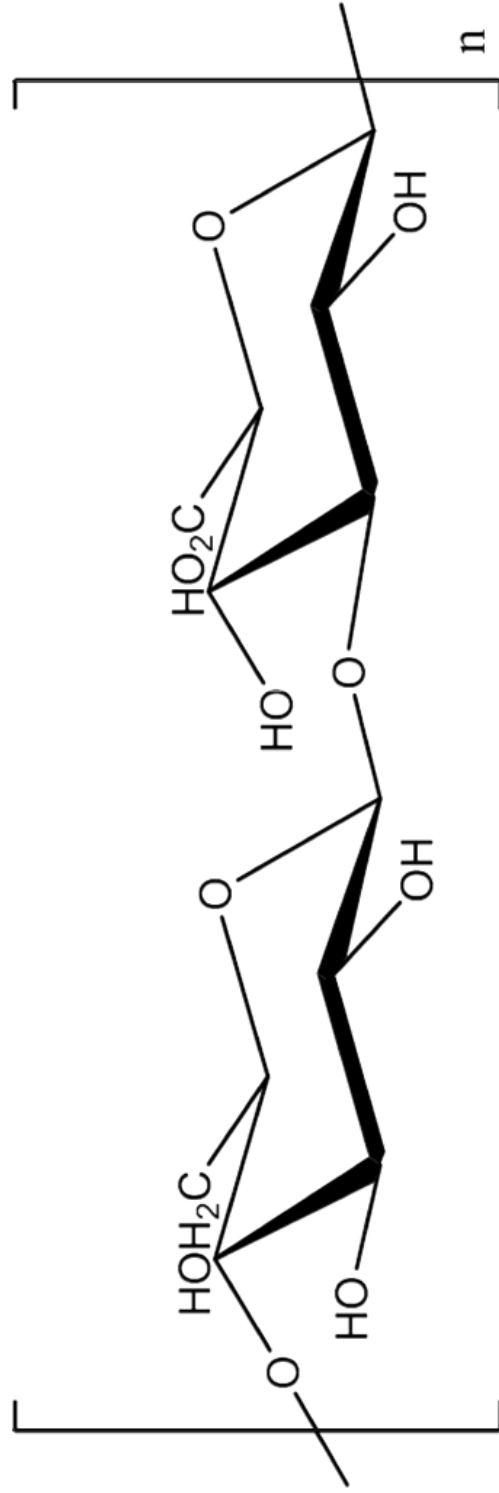


FIGURA 6

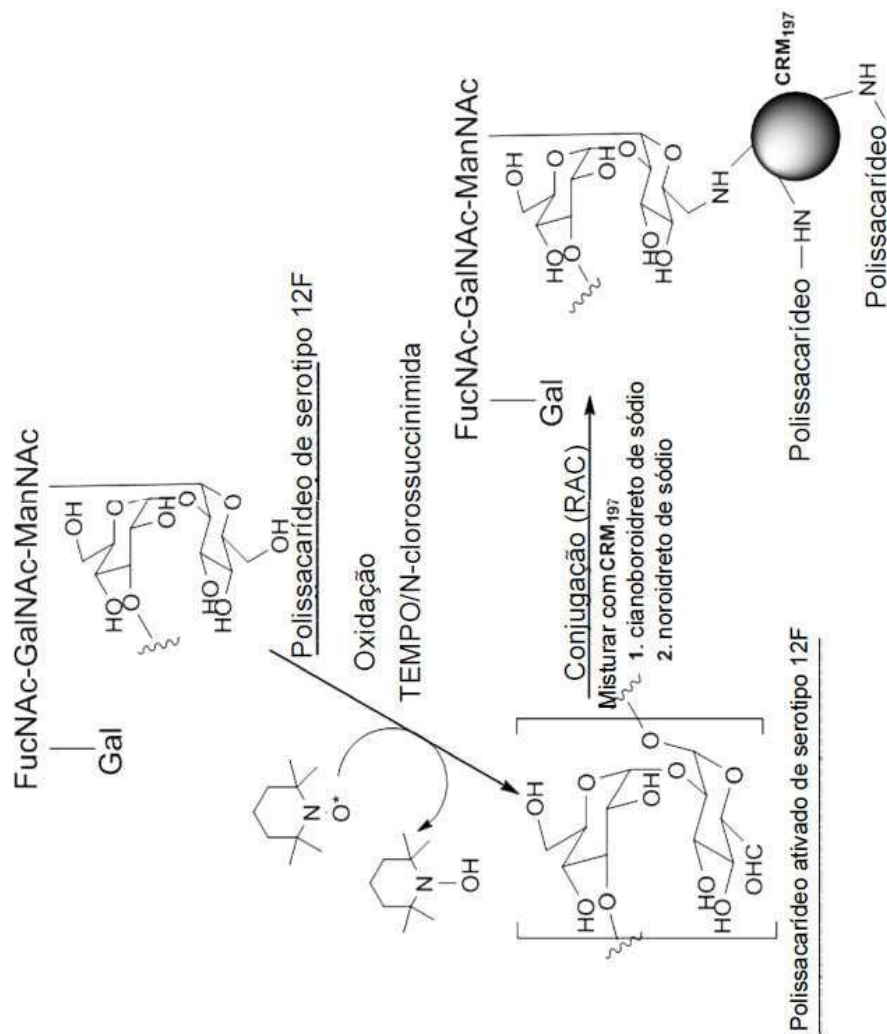


FIGURA 7

