



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

(21) **PI 0612654-5 A2**

(22) Data de Depósito: 23/06/2006
(43) Data da Publicação: 02/10/2012
(RPI 2178)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/095
A61K 39/102
A61K 39/116
A61P 31/04
C07K 17/10

(54) Título: MÉTODO DE PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA, USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA E MÉTODO DE PREVENIR OU TRATAR UMA DOENÇA

(30) Prioridade Unionista: 27/06/2005 GB 0513069.5, 27/06/2005 GB 0513071.1, 28/07/2005 GB 0515556.9, 28/11/2005 GB 0524204.5, 21/12/2005 GB 0526040.1, 21/12/2005 GB 0526041.9, 28/11/2005 GB 0524204.5, 21/12/2005 GB 0526040.1, 21/12/2005 GB 0526041.9

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

(72) Inventor(es): PIERRE DUVIVIER, RALPH LEON BIEMANS

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006006270 de 23/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/000343de 04/01/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA, USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA E MÉTODO DE PREVENIR OU TRATAR UMA DOENÇA. O presente pedido expõe um método aperfeiçoado para a condução de reações de conjugação de sacarídeo-proteína usando o processo químico de condensação de carbodiimida. Dependendo da natureza do sacarídeo ou do carregador de proteína envolvido, a qualidade do conjugado pode ser aperfeiçoada através da adição de um dos componentes da reação lentamente à mistura da reação. São adicionalmente providas composições imunogênicas, que compreendem conjugados de sacarídeo-proteína produzidos através dos métodos expostos.

“MÉTODO DE PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA, USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA E MÉTODO DE PREVENIR OU TRATAR UMA DOENÇA”

5 **Processo para a manufatura de vacinas**

A presente invenção refere-se a métodos aperfeiçoados para a condução de reações de condensação de carbodiimida. Em particular, ele refere-se à conjugação de sacarídeos de proteínas usando condensação de carbodiimida. Ele refere-se também a composições imunogênicas, que podem ser produzidas compreendendo os conjugados de sacarídeo – proteína da invenção.

O uso de polissacarídeos capsulares bacterianos tem sido amplamente usado em imunologia, durante muitos anos, para a prevenção da doença bacteriana. Um problema com referência a um tal uso, no entanto, é a natureza independente de T da resposta imune. Estes antígenos são, deste modo, fracamente imunogênicos em crianças pequenas. Este problema tem sido superado através da conjugação de antígenos de polissacarídeo a um veículo de proteína (uma fonte de epítomos auxiliares T), que podem ser então usados de modo a causar uma resposta imune dependente de T, mesmo no primeiro ano de vida.

Várias técnicas de conjugação são conhecidas na arte. Os conjugados podem ser preparados através de métodos de aminação reductiva, tal como descrito na US 4365170 (Jennings) e na US 4673574 (Anderson). Outros métodos são descritos na EP-0-161-188, EP-2083675 e EP-0-477508. O método de conjugação pode, de modo alternativo, ser baseado na ativação de grupos hidroxila do sacarídeo com tetrafluoroborato de 1-ciano-4-

dimetilamino piridínio (CDAP), de modo a formar um éster de cianato. O sacarídeo ativado pode ser assim acoplado diretamente através de um grupo espaçador (de ligação) a um grupo amino da proteína portadora. Por exemplo, o éster de cianato pode ser acoplado com hexano diamina ou diidrazida de ácido adípico (ADH ou AH) e o sacarídeo derivado de amino é conjugado à proteína portadora usando química de carbodiimida (por exemplo EDAC ou EDC) através de um grupo carboxila no veículo da proteína. Tais conjugados são descritos no pedido PCT publicado WO 93/15760 Uniformed Services University e WO 95/08348 e WO 96/29094. Vide também Chu C. et al. Infect. Immunity, 1983, 245 256.

De modo geral, os seguintes tipos de grupos químicos em um veículo de proteína podem ser usados para o acoplamento/conjugação:

A) Carboxila (por exemplo, através de ácido aspártico ou ácido glutâmico), que pode ser conjugado a grupos amino naturais ou derivados em porções de sacarídeo usando química de carbodiimida;

B) Grupo amino (por exemplo, através de lisina), que pode ser conjugado a grupos carboxila naturais ou derivados em porções de sacarídeo usando química de carbodiimida;

C) Sulfidrila (por exemplo, através de cisteína);

D) Grupo hidroxila (por exemplo, através de tirosina);

E) Grupo imidazolila (por exemplo, através de histidina);

F) Grupo guanidila (por exemplo, através de arginina); e

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

Em um sacarídeo, de modo geral, os grupos que se seguem podem ser usados para um acoplamento: OH, COOH ou NH₂. Os grupos aldeído podem ser gerados através de tratamentos diferentes conhecidos na arte, tais que: periodato, hidrólise ácida, peróxido de hidrogênio, etc.

Abordagens de acoplamento direto:

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

conjugado

Sacarídeo – aldeído + NH_2 – Prot $\rightarrow$ Base de Schiff + $\text{NaCNBH}_3 \rightarrow$ conjugado

Sacarídeo – aldeído + NH_2 -Prot $\rightarrow$ + EDAC $\rightarrow$ conjugado

5 Sacarídeo – NH_2 + COOH – Prot + EDAC $\rightarrow$ conjugado

Acoplamento indireto através de abordagens de espaçador (agente de ligação):

Sacarídeo-OH + CNBr ou CDAP $\rightarrow$ éster de cianato + NH_2 ---- $\text{NH}_2 \rightarrow$ saacarídeo ---- NH_2 + COOH – Prot + EDAC $\rightarrow$ conjugado

10 Sacarídeo –OH + CNBr ou CDAP $\rightarrow$ éster de cianato + NH_2 ---SH $\rightarrow$ sacarídeo--- SH + maleimida – Prot (modificação de grupos amino) $\rightarrow$ conjugado

Sacarídeo – COOH + EDAC + NH_2 --- $\text{NH}_2 \rightarrow$ sacarídeo ---- NH_2 + EDAC + COOH – Prot $\rightarrow$ conjugado

15 Sacarídeo – COOH + EDAC + NH_2 ---SH $\rightarrow$ sacarídeo --- SH + SH-prot (Proteína nativa com uma cisteína exposta ou obtida após a modificação de grupos amino da proteína através, por exemplo, de SPDP) $\rightarrow$ Sacarídeo- S- S- Prot

20 Sacarídeo – COOH + EDAC + NH_2 ---SH $\rightarrow$ sacarídeo ----SH + maleimida – Prot (modificação de grupos amino) $\rightarrow$ conjugado

Sacarídeo- Aldeído + NH_2 ---- $\text{NH}_2 \rightarrow$ sacarídeo---- NH_2 + EDAC + COOH - Prot $\rightarrow$ conjugado

25 Como pode ser observado através de química de carbodiimida (por exemplo através do uso de EDAC) é muito conveniente para reações de conjugação, pois ele utiliza grupos no sacarídeo e/ou proteína, que podem naturalmente estar presentes ou ser facilmente inseridos através de derivação. De modo conveniente, ele também liga porções através de uma ligação de peptídeo.

Carbodiimidas ($\text{RN} = \text{C} = \text{NR}'$) são compostos insaturados

com uma estrutura aleno (Nakajima e Ikada, 1995, Bioconjugate Chem. 6:123-130; Hoare e Koshland, 1967, JBC 242: 2447- 2453). A substância química é relativamente instável em seu pH de reação (4,5- 6,5), e, portanto, todos os componentes da reação de conjugação de
5 sacarídeo/proteína/carbodiimida tendem a ser adicionados, de um modo conjunto, na arte.

Os presentes inventores verificaram que, dependendo da natureza do sacarídeo e da proteína a serem conjugados, melhores características do conjugado final para o uso da vacina podem ser alcançados
10 através da adição de um certo componente da reação lentamente à mistura. Assim o fazendo, um ou mais benefícios/aperfeiçoamentos podem ser realizados, tais que: o rendimento de sacarídeo no conjugado, a capacidade de filtração do conjugado, melhor controle da conjugação, capacidade de reprodução mais fácil, e/ou prevenção de reticulações intra- porção.

15 Deste modo, em uma modalidade, é provido um método para conjugar um sacarídeo a um veículo de proteína, usando química de condensação de carbodiimida, em que o sacarídeo compreende (por exemplo como parte de sua unidade de repetição) ou foi derivado de modo a compreender, grupos amino e/ou carboxila, e em que o veículo da proteína
20 compreende, ou foi derivado de modo a compreender, grupos amino e/ou carboxila, compreendendo os estágios de:

I) se o veículo da proteína compreender tanto grupos amino e carboxila e o sacarídeo compreender ou grupos amino ou carboxila:

a) misturar o sacarídeo e a alíquota de carbodiimida requeridos
25 para efetuar a conjugação, e

b) adicionar a alíquota do veículo da proteína requerido durante um período de 35 segundos a 6 horas;

II) se o sacarídeo compreender tanto grupos amino e carboxila e o veículo da proteína compreender ou grupos amino ou carboxila:

a) misturar o veículo da proteína e a alíquota de carbodiimida requeridos para efetuar a conjugação, e

b) adicionar a alíquota de sacarídeo requerida durante um período de 35 segundos a 6 horas;

5 III) se o sacarídeo compreender tanto grupos amino e carboxila e o veículo da proteína compreender

Tanto grupos amino e carboxila:

a) misturar o veículo da proteína e o sacarídeo, e

b) adicionar a alíquota de carbodiimida requerida para efetuar a conjugação durante um período de 35 segundos a 6 horas.

Descrição Detalhada:

Qualquer carbodiimida adequada pode ser usada, desde que ela seja capaz de conjugar os sacarídeos e as proteínas em um meio aquoso. Em uma modalidade, a carbodiimida pode ser EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-
15 amnopropil) carbodiimida) [também conhecida como EDC] ou pode ser outra carbodiimida, que não EDAC.

O termo “sacarídeo” em todo este relatório pode indicar um polissacarídeo ou oligossacarídeo e inclui ambos. Ele pode indicar lipopolissacarídeo (LPS) ou polipoligossacarídeo (LOS). Antes do uso, os
20 polissacarídeos (tais que polissacarídeos bacterianos) podem ser isolados a partir de uma cepa de origem (por exemplo, de bactérias) ou isolado a partir da cepa de origem e dimensionado em algum grau através de métodos conhecidos (vide, por exemplo, a EP 497524 e a EP 497525; Shousun Chen Szu et al.- Carbohydrate Resarch Vol. 152, págs. 7- 20 (1986), por exemplo,
25 através de microfluidização. Os polissacarídeos podem ser dimensionados de modo a reduzir a viscosidade em amostras de polissacarídeo e/ou de modo a aperfeiçoar a capacidade de filtração quanto a produtos conjugados. Os oligossacarídeos possuem um baixo número de unidades de repetição (de modo típico, 5- 30 unidades de repetição) e são, de modo típico,

polissacarídeos hidrolisados.

O termo “veículo de proteína” tem a intenção de abranger tanto peptídeos pequenos como polipeptídeos grandes (> 10 kDa). De um modo claro, os polipeptídeos estão mais propensos a conter tanto grupos amino e carboxila reativos, sem qualquer modificação.

Para os propósitos da invenção, “polissacarídeo nativo” refere-se a uma sacarídeo, que não foi submetido a um processo, cujo propósito é o de reduzir o tamanho do sacarídeo. Um polissacarídeo pode ter o seu tamanho ligeiramente reduzido durante os procedimentos de purificação normais. UM tal sacarídeo é ainda nativo. Apenas se o polissacarídeo tiver sido submetido a técnicas de dimensionamento, o polissacarídeo não seria então considerado nativo.

Para os propósitos da invenção, “dimensionado em um fator de até $\times 2$ ” refere-se ao fato de que o sacarídeo é submetido a um processo com a intenção de reduzir o tamanho do sacarídeo, mas de modo a reter um tamanho de mais do que a metade do tamanho do polissacarídeo nativo. X3, X4, etc. devem ser interpretados do mesmo modo, isto é, o sacarídeo é submetido a um processo, que se destina a reduzir o tamanho do polissacarídeo, mas de modo a reter um tamanho de mais do que um terço, um quarto, etc. do tamanho do polissacarídeo nativo.

O período de tempo de 35 segundos a 6 horas no estágio b) do método para a adição da alíquota total do componente final pode ser de 50 segundos a 5 horas, de 1 minuto a 4 horas, de 2 minutos a 3 horas, de 3 minutos a 2 horas, de 4 a 60 minutos, de 5 a 50 minutos, de 6 a 40 minutos, de 7 a 20 minutos, ou de 8 a 20 minutos. Ele pode ser de 1 minuto a 5 horas, de 10 minutos a 4 horas, de 20 minutos a 3 horas, de 30 minutos a 2 horas, de 40 a 90 minutos, ou de 50 a 70 minutos. Este período de tempo pode ser ajustado de acordo com o sacarídeo e a proteína específicos sendo conjugados.

Em uma modalidade, a alíquota do componente final (por

exemplo, de carbodiimida, sacarídeo ou proteína) é adicionada à mistura da reação em uma taxa constante durante o período de tempo (isto é alcançado, de modo conveniente, através do uso de uma bomba que opera em uma velocidade constante). De um modo alternativo, ele pode ser adicionado em

5 estágios, ao longo do período de tempo. Embora isto possa ser executado de muitos modos, de modo geral, partes da alíquota devem ser adicionados ao longo do período. Por exemplo, pelo menos um quarto da alíquota pode ser adicionado ao longo da primeira metade do período, e pelo menos um quarto da alíquota durante a segunda metade do período. A quantidade total da

10 alíquota "a" medida, por exemplo, em ml ou mg, pode ser adicionada em de 4- 100 estágios ("s") ao longo de todo o período. Em uma modalidade, os estágios são dispostos de tal modo que uma quantidade uniforme (a/s) seja introduzida em todos os estágios. Em uma modalidade, os estágios são uniformemente espaçados ao longo do período "p" (em segundos). Deste

15 modo, se um estágio ocorrer em um tempo zero do período "p", então cada estágio subsequente ocorreria

Em um tempo que é $p/(s-1)$. O volume da alíquota do componente final adicionado no estágio b) pode ser ajustado em termos da facilidade de adição da alíquota à reação dentro do período de tempo

20 desejado. A carbodiimida pode ser adicionada como uma solução aquosa (de modo típico tamponada em um pH de 7,5 antes de ser adicionada à reação) ou como um pó sólido (por exemplo, EDAC é altamente solúvel em meio aquoso). Naturalmente, se a carbodiimida for o último componente adicionado à reação (situação do estágio III b)), uma carbodiimida de

25 dissolução lenta pode ser usada, de tal modo que a alíquota de pó total seja adicionada à reação de uma única vez, mas seja dissolvida em uma taxa consistente com o período desejado, ao longo do qual a alíquota deve ser tornada disponível para a reação.

Se a proteína e/ou sacarídeo não tiver grupos amino ou

carboxila (ou possuir apenas um destes), ela pode ser derivada de modo a fornecer um (ou de modo a fornecê-lo se o outro não já o tiver). Por exemplo, para um sacarídeo, que compreenda apenas grupos hidroxila reativos (por exemplo, o sacarídeo capsular do sorogrupo A meningocócico), um tal grupo

5 deve ser usado para a derivação em grupos amino ou carboxila, de tal modo que a condensação de EDAC possa ser executada.

Isto pode ocorrer dentro de uma subunidade de repetição, ou pode ser um grupo apenas presente no final da molécula de sacarídeo.

Deve ser notado que, quando ocorre a derivação, pode ser

10 benéfico derivar apenas parcialmente a porção. Para sacarídeos com subunidades de repetição, o epítipo alvo pode estar presente em cada repetição. Portanto, se ocorrer a derivação parcial (por isto é compreendido que de 0,5- 20, 1-15, 3-12, ou 5-10%) do grupo reativo alvo é efetivamente derivado) isto pode conferir o benefício de que seja conservada a maioria dos

15 epítipos, e que seja também evitada a reticulação excessiva.

Se um sacarídeo ou proteína já tiver apenas grupos amino ou carboxila (por exemplo, sacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, que possui naturalmente carboxila, mas não grupos amino), a derivação pode ocorrer de modo a fornecê-lo ao outro tipo de grupo (isto é, grupos amino para Vi). Deve

20 ser notado, no entanto, que como a derivação pode ser parcial, esta ação pode alterar a reação preferida da invenção a partir de um tipo I para um tipo III. Por exemplo, se o sacarídeo VI for conjugado a um veículo de proteína, que compreenda tanto grupos amino, como carboxila, a situação I adiciona a alíquota de proteína lentamente no estágio b). Se o grupo carboxila do

25 sacarídeo Vi for parcialmente derivado com grupos amino, ele terá tanto grupos carboxila, como grupos amino, deste modo a situação III adicionando a alíquota de carbodiimida lentamente no estágio b) se torna mais relevante.

A derivação pode ocorrer através da adição de um agente de ligação hetero- ou homo- bifuncional. Ela pode ocorrer com química similar,

como acima descrito para o estágio de conjugação de sacarídeo-proteína (por exemplo química de CDAP ou de carbodiimida). O agente de ligação pode ter entre 4 e 20, 4 e 12, 5 e 10 átomos de carbono. Ele pode ter dois grupos amino reativos, dois grupos carboxila reativos, ou um e cada (por exemplo, hexano diamina, ácido 6-aminocapróico, ou diidrazida de ácido adípico). De modo típico, a derivação ocorre através da reação de um grande excesso do agente de ligação com o sacarídeo e/ou proteína ser derivado. Isto permite com que a derivação ocorra com reticulação intra- porção mínima (o que, por outro lado, poderia ser possível se, por exemplo, um grupo carboxila em um sacarídeo estivesse sendo derivado com grupos amino usando condensação de carbodiimida). Agente de ligação em excesso é prontamente removido usando técnicas, tais que diafiltração.

Em uma modalidade, o sacarídeo compreende um grupo hidroxila reativo como parte de sua unidade de repetição, que é parcialmente derivada através de um grupo amino no agente de ligação (por exemplo, com química de CDAP). Em uma outra modalidade, o sacarídeo compreende um grupo amino reativo como parte de sua unidade de repetição, que é prontamente derivada através de um grupo carboxila no agente de ligação (por exemplo, com química de carbodiimida). Em uma modalidade adicional, o sacarídeo compreende um grupo carboxila reativo como parte de sua unidade de repetição, que é parcialmente derivada através de um grupo amino no agente de ligação (por exemplo, com química de carbodiimida).

A alíquota de carbodiimida requerida para executar a conjugação (seja presente no estágio a) ou b) da reação da invenção) é de 0,01 a 3, de 0,05 a 2 ou de 0,09 a 1 mg de carbodiimida/mg de sacarídeo. Embora estes números sejam calculados considerando que o EDAC seja a carbodiimida, estes números podem ser ajustados se qualquer outra carbodiimida for usada, através da multiplicação dos números na faixa por: (peso molecular de outra carbodiimida)/(peso molecular de EDAC).

De modo geral, o sacarídeo pode estar presente nos métodos da invenção em uma concentração final de 0,5- 50 mg/ml no estágio b). Isto irá depender do tamanho e da natureza do sacarídeo e da extensão de qualquer derivação. Por exemplo, para os oligossacarídeos uma concentração maior
5 será requerida, mas para polissacarídeos grandes uma concentração muito menor será mais apropriada.

Se for em direção à alta terminação de grupos amino ou carboxila parcialmente derivados, uma concentração menor pode ser apropriada para reduzir a possibilidade de qualquer reticulação. O veículo da
10 proteína pode estar presente em uma concentração final de 1- 50 mg/ml no estágio b).

A razão inicial de veículo de proteína para sacarídeo nos métodos da invenção pode ser de 5:1 a 1: 5, de 4:1 a 1: 1, ou de 3:1 para 2:1 (p/p). De novo, isto irá depender do tamanho e da natureza do sacarídeo, e da
15 extensão de qualquer derivação.

As condições do sal (por exemplo, NaCl) podem ser também variadas de acordo com a natureza do sacarídeo/proteína. De modo usual, cerca de NaCl 0,2 M podem estar presentes no estágio b) dos métodos da invenção, mas podem ser de 0-2, 0,1-1 ou de 0,2 - 0,5 M.

Em termos do pH no estágio b) dos métodos da invenção, o pH da reação pode ser qualquer pH, em que a carbodiimida seja ativada- por exemplo, um pH de 4,5- 6,5. De 4, 7 – 6,0, ou de 5- 5,5. Este pH é, de modo típico, mantido ao longo da reação através da adição de ácido/base, conforme requerido. O EDAC é, de modo usual, estável em pH de 7,5, embora se a
20 conjugação requerer que seja executada em compostos de pH mais alto, que são conhecidos como mantendo o intermediário da reação estável (tal que N-hidroxissuccinimida) podem também estar presentes na reação no estágio b), em cujo caso, o pH da reação no estágio b) pode ser mantido em um pH de 4,5-7,5.

A temperatura da reação durante o estágio b) dos métodos da invenção pode ser de 4- 37, de 10-32, de 17- 30, ou de 22- 27°, e é mantido, de modo típico, através de toda a reação.

5 Nos métodos da invenção, uma vez que toda a alíquota tenha sido adicionada no estágio b), a reação é mantida, de modo típico, durante um período adicional de 10 minutos a 72 horas, de 20 minutos a 48 horas, de 30 minutos a 24 horas, de 40 minutos a 12 horas, de 50 minutos a 6 horas, ou de 1-3 horas. Uma vez completada a reação, o pH é ajustado para de 7, 5- 9 (na terminação mais alta em que este N-hidroxissuccinimida está presente) para que volte à faixa de pH estável da carbodiimida.

10 Uma vez conjugado, o conjugado de sacarídeo – proteína pode ser purificado a partir de: componentes não- reagidos, sacarídeo livre, etc., através da sua injeção em uma coluna de cromatografia de exclusão de tamanho (por exemplo, Sephacryl S 400 HR, *Pharmacia*). Este é, de modo
15 típico, executado em de 2-8°C. O conjugado pode ser filtrado de modo estéril quando armazenado. Ultimamente, uma dose efetiva (por exemplo, de 1-20, 2-15, ou 3- 10 µg de sacarídeo/dose) do conjugado de sacarídeo – proteína pode ser formulados com um excipiente farmacologicamente aceitável (por exemplo, um sal ou adjuvante) de modo a manufaturar uma composição
20 imunogênica ou vacina.

 Em termos dos sacarídeos da invenção, qualquer sacarídeo de fonte viral, fúngica, bacteriana ou eucariótica pode ser conjugado usando os métodos da invenção. Ele pode ser o sacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, ou um outro sacarídeo diferente de Vi. Ele pode ser o sacarídeo capsular Hib de *H.*
25 *influenzae* do tipo b, ou ele pode ser um sacarídeo diferente de Hib. Em uma modalidade, o sacarídeo é um sacarídeo capsular bacteriano, por exemplo derivado a partir de uma bactéria selecionada a partir de uma lista que consiste de: sorogrupo A de *N. meningitidis* (MenA), B (MenB), C (MenC), W135 (MenW) ou Y (MenY), sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* 1, 2, 3,

4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12 F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 20, 22 F, 23 F, ou 33 F, grupo Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, ou VII, de *Streptococcus* do Grupo B, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella Typhi* (sacarídeo Vi), *Vibrio cholerae*, ou *H. influenzae* do tipo b.

5 O peso molecular médio em peso do sacarídeo pode ser de 1000- 2000000, 5000-1000000, 10000 - 500000, 50000- 400000, 75000- 300000, ou 100000-200000. O peso molecular ou o peso molecular médio de um sacarídeo neste caso refere-se ao peso molecular médio em peso (Mw) do sacarídeo, medido antes da conjugação e é medido através de MALLS. A

10 técnica de MALLS é bem conhecida na arte e é, de modo típico, executada como descrito no Exemplo 2. Para a análise de MALLS de sacarídeos, duas colunas (TSKG 6000 e 5000 Wxl) podem ser usadas em combinação e os sacarídeos são eluídos em água. Os sacarídeos são detectados usando um

15 detector de dispersão luminosa (por exemplo Wyatt Dawn DSP, equipado com um laser de argônio de 10 mW as 488 nm) e um refratômetro interferométrico (por exemplo, Wyatt Otilab DSP, equipado com uma célula P 100 e um filtro vermelho a 498 nm). Em uma modalidade, a polidispersividade do sacarídeo é de 1-1,5, 1- 1,3, 1-1,2, 1-1,1 ou 1-1,05, e após a conjugação a uma proteína portadora, a polidispersividade do

20 conjugado é de 1, 0- 2, 5, 1, 0-2, 0, 1, 0- 1, 5, 1,0 - 1,2, 1,5 - 2,5, 1,7 - 2,2 ou 1,5 - 2,0. Todas as medições de polidispersividade são executadas através de MALLS.

O sacarídeo pode ser ou um polissacarídeo nativo ou pode ser dimensionado em um fator de não mais do que 2, 4, 6, 8, 10 ou 20 vezes (por

25 exemplo, através de microfluidização [por exemplo, através de um aparelho Emulsiflex C-50] ou outra técnica conhecida [por exemplo, métodos térmico, químico, de oxidação, ou de tratamento sônico]). Os oligossacarídeos podem ter sido dimensionados substancialmente de modo adicional [por exemplo, através de métodos térmico, químico, ou de oxidação conhecidos].

As estruturas da maior parte destes sacarídeos são conhecidas (e portanto, se eles possuem naturalmente grupos amino ou carboxila para a química de carbodiimida, ou qualquer outro grupo reativo que possa ser derivado com grupos amino ou carboxila (vide tabela abaixo).

	Grupo NH ₂ Natural	Grupo COOH Natural	Outro grupo reativo
<i>S. aureus</i>			
PS5	Não	Sim	OH
PS8	Não	Sim	OH
<i>N. meningitidis</i>			
MenA	Não	Não	OH
MenC	Não	Sim	OH
MenW135	Não	Sim	OH
MenY	Não	Sim	OH
MenB	Não (pode ser gerado se des-N- acetilado)	Sim	OH/N- propila
Grupo B. Streptococcus			
Ia, Ib	Não	Sim	OH
II	Não	Sim	OH
III	Não	Sim	OH
IV	Não	Sim	OH
V	Não	Sim	OH
VI	Não	Sim	OH
VII	Não	Sim	OH
<i>S. typhi</i>			
VI	Não	Sim	Não
<i>S. pneumoniae</i>			
PS1	Sim	Sim	OH
PS3, 4, 5, 8, 9, 12F	Não	Sim	OH
<i>Vibrio cholerea</i>			
Sacarídeo capsular	Sim	Não	OH
<i>H. influenzae</i> B Hib	Não	Sim	OH
LOS			
Nmen/Mcat/Hi	Sim em PEA	Sim em KDO	OH

5 O sacarídeo pode ser um lipoligossacarídeo ou um lipopolissacarídeo bacteriano (vide a tabela acima), por exemplo derivado a partir de uma bactéria selecionada a partir de uma lista, que consiste de:

N. meningitidis, *H. influenzae*, *E. coli*, *Salmonella* ou *M.*

catarrhalis. O LOS pode ser um imunotipo meningocócico L2, L3, ou L10. Ele pode ser destoxificado através de um tratamento alcalino de sua porção de Lipídeo A.

Em uma modalidade, o sacarídeo capsular MenA é pelo menos parcialmente O-acetilado, de tal modo que pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% das unidades de repetição sejam O-acetiladas em pelo menos uma posição. A O-acetilação está presente, por exemplo, pelo menos na posição O-3 de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% das unidades de repetição. Em uma modalidade, o sacarídeo capsular MenC é pelo menos parcialmente O-acetilado, de tal modo que pelo menos 30%, 40%, 50%, 60 %, 70 %, 80%, 90%, 95% ou 98% das unidades de repetição NeuNAc ($\alpha 2 \rightarrow 9$)- ligadas sejam O-acetiladas em pelo menos uma ou duas posições. A O-acetilação está presente, por exemplo, na posição O-7 e/ou O-8 de pelo menos 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% das unidades de repetição. Em uma modalidade, o sacarídeo capsular MenW é pelo menos parcialmente O-acetilado, de tal modo que pelo menos 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% das unidades de repetição seja O-acetiladas em pelo menos uma ou duas posições. A O-acetilação está presente, por exemplo, na posição O-7 e/ou O-9 de pelo menos 30%, 40%, 50%, 60 %, 70 %, 80%, 90%, 95% ou 98% das unidades de repetição. Em uma modalidade, o sacarídeo capsular MenY é pelo menos parcialmente O-acetilado, de tal modo que pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% das unidades de repetição sejam O-acetiladas em pelo menos uma ou duas posições. A O-acetilação está presente na posição 7 e/ou 9 de pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% das unidades de repetição. O percentual de O-acetilação refere-se ao percentual das unidades de repetição contendo O-acetilação. Isto pode ser medido no sacarídeo antes do conjugado e/ou após a conjugação.

O veículo da proteína pode ser qualquer peptídeo ou proteína.

Ele pode compreender um ou mais epítomos de auxiliar T. Em uma modalidade da invenção, o veículo da proteína é selecionado a partir do grupo, que consiste de: TT, DT, CRM 197, fragmento C de TT, proteína D de *H. influenzae*, PhtD pneumocócico e Pneumolisina pneumocócica. A proteína

5 portadora pode ser o toxóide do tétano (TT), o fragmento C de toxóide do tétano, mutantes não tóxicos da toxina do tétano [observe-se que todas as variantes de TT são consideradas como sendo o mesmo tipo de proteína portadora para os propósitos desta invenção], toxóide de difteria (DT) CRM 197, outros mutantes não- tóxicos de toxina de difteria [tais que CRM 176,

10 CRM 197, CRM 228, CRM 45 (Uchida et al. J. Biol. Chem. 218; 3838- 3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM 102, CRM 103 e CRM 107 e outras mutações descritas por Nicholls e Youle em Genetically Engineered Toxins, Ed.: Frankel, Maecel Dekker Inc., 1992; deleção ou mutação de Glu-148 para Asp, Glan ou Ser e/ou Ala 158 para Gly e outras mutações expostas na US

15 4709017 ou US 4950740; mutação de pelo menos um ou mais resíduos Lys 516, Lys 526, Phe 530 e/ou Lys 534 e outras mutações descritas na US 599170127 ou UD 6455673; ou o fragmento exposto na US 5843711] (observe-se que todas tais variantes de DT são consideradas como sendo o

20 mesmo tipo de proteína portadora para os propósitos desta invenção), pneumolisina pneumocócica (Kuo et al. (1995), *Infect. Immun.* 63; 27-6- 13), OMPC (proteína da membrana externa meningocócica - usualmente extraída do sorogrupo B de *N.meningitidis* – EP 0372501), peptídeos sintéticos (EP 0378881, EP 0427347), proteínas de choque térmico (WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas pertussis (WO 98/58668, EP 0471177), citoquinas,

25 linfoquinas, fatores do crescimento ou hormônio (WO 91/01146), proteínas artificiais compreendendo epítomos de célula CD4 + T humano múltiplo a partir de vários antígenos derivados de patógeno (Falugi et al. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31; 3816- 3824), tais que a proteína N19 (Baraldoi et al. (2004), *Infect. Immun.* 72; 4884 – 7), proteína superficial pneumocócica PspA (WO

02/091998), proteínas de absorção de ferro (WO 01/72337), toxina A ou B de *C. difficile* (WO 00/61761), Proteína D de *H. influenzae* (EP594610 e WO 00/56360), phtA pneumocócico (WO 98/18930, também referida como Sp 36), phD pneumocócico (exposto na WO 00/37105, e também referido na
5 Sp036D), PhtB pneumocócico (exposto na WO 00/37105 e também referido como Sp036B), ou PhtE (exposto na WO 00/30299 e referido como BVH-3).

Em um outro aspecto da invenção, é provido um conjugado de veículo de sacarídeo –proteína (ou uma composição imunogênica ou vacina), que pode ser obtido através do método da invenção.

10 Um uso da composição imunogênica ou vacina da invenção na manufatura de um medicamento para a prevenção ou tratamento de doença, e um método para a prevenção ou tratamento de doença, que compreende o estágio de administrar uma dose efetiva da composição imunogênica ou vacina da invenção a um paciente, que esteja em necessidade da mesma é
15 adicionalmente provido. O uso ou método pode ser tal que a doença seja causada por uma bactéria selecionada a partir de uma lista, que consiste de: *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *Streptococcus* do grupo B, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, e *H. influenzae*.

20 As composições imunogênicas da invenção podem também compreender uma vacina de DTPa ou DTPw (por exemplo, uma contendo DT, TT, e ou uma vacina pertussis de célula inteira (Pw) ou uma vacina pertussis acelular (Pa) (que compreende, por exemplo, toxóide de pertussis, FHA, pertactina, e, de modo opcional, aglutinoginas 2 e 3). Tais combinações
25 podem também compreender uma vacina contra hepatite B (por exemplo, elas podem compreender o antígeno superficial de hepatite B ([HepB], opcionalmente adsorvido sobre fosfato de alumínio). Em uma modalidade, a composição imunogênica da invenção compreende os conjugados de sacarídeo Hib, MenA e MenC, u os conjugados de sacarídeo Hib e MenC, ou

os conjugados de sacarídeo Hib, MenC e MenY, ou conjugados de sacarídeo MenA, MenC, MenW e MenY, em que pelo menos um, dois ou todos os conjugados de sacarídeo são produzidos de acordo com o método da invenção.

5 As composições imunogênicas de acordo com a invenção compreendem, de modo opcional, antígenos virais adicionais, que conferem proteção contra a doença causada por sarampo e/ou caxumba e/ou rubéola e/ou varicela. Por exemplo, a composição imunogênica da invenção contém antígenos de sarampo, caxumba e rubéola (MMR) ou sarampo, caxumba,
10 rubéola e varicela (MMRV). Em uma modalidade, estes antígenos virais estão opcionalmente presentes no mesmo recipiente que o(s) conjugado(s) de sacarídeo meningocócico e/ou Hib presente na composição. Em uma modalidade, estes antígenos virais são liofilizados.

Em uma modalidade, a composição imunogênica de acordo
15 com a invenção compreende ainda um antígeno do sorogrupo B de *N.meningitidis*. O antígeno é, de modo opcional, uma preparação de vesícula de membrana externa do sorogrupo B de *N.meningitidis*, tal como descrito na EP 301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 e WO 04/14419.

De modo geral, a composição imunogênica da invenção pode
20 compreender uma dose de cada conjugado de sacarídeo entre 0,1 e 20 µg, 2 e 10 µg, 2 e 6 µg ou 4 e 7 µg de sacarídeo.

“Em torno de” ou “aproximadamente” são definidos como dentro de 10% mais ou menos do valor dado para os propósitos da invenção.

Em uma modalidade, a composição imunogênica da invenção
25 é ajustada para ou tamponada em, ou ajustada a um pH de entre 7,0 e 8,0, pH de 7,2 e 7,6 ou em torno de ou exatamente do pH de 7,4.

A composição imunogênica ou as vacinas da invenção são opcionalmente liofilizadas na presença de um agente de estabilização, por exemplo um poliol, tal que sacarose ou trealose.

De modo opcional, a composição imunogênica ou a vacina da invenção contém uma quantidade de um adjuvante, suficiente para aumentar a resposta imune ao imunogene. Adjuvantes adequados incluem, mas não estão limitados a, sais de alumínio (fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio), misturas de esqualeno (SAF-1), peptídeo de muramila, derivados de saponina, preparações de parede celular de micobacterium, lipídeo A de monofosforila, derivados do ácido micótico, tensoativos de copolímero em bloco não- iônico, Quil A, subunidade de toxina B de cólera, polifosfazeno e derivados de complexos imunoestimulantes (ISCOMs), tais que aqueles descritos por Takashashi et al. (1990) Nature 344: 873- 875.

Para combinações de *N. meningitidis* ou HibMen, é vantajoso não usar qualquer adjuvante de sal de alumínio ou nenhum adjuvante.

Como no caso de todas as composições imunogênicas ou vacinas, as quantidades imunologicamente efetivas dos imunogenes precisam ser determinadas de modo empírico. Os fatores a serem considerados incluem a imunogenicidade, se ou não o imunogene será complexado com ou covalentemente ligado a um adjuvante ou proteína portadora ou outro veículo, a via de administração e o número de dosagem de imunização a serem administradas.

O agente ativo pode estar presente, em concentrações variáveis, na composição farmacêutica ou vacina da invenção. De modo típico, a concentração mínima da substância é uma quantidade necessária para que seja alcançado o seu uso intencionado, enquanto que a concentração máxima é a concentração máxima que irá permanecer em solução ou homogeneamente suspensa dentro da mistura inicial. Por exemplo, a quantidade mínima de um agente terapêutico é, de modo opcional, uma que irá prover uma única dosagem terapeuticamente efetiva. Para as substâncias bioativas, a concentração mínima é a quantidade necessária para a bioatividade mediante a reconstituição e a concentração máxima é o ponto em

que uma suspensão homogênea não pode ser mantida. No caso de unidades de dose única, a quantidade é aquela de uma única aplicação terapêutica. De modo geral, é esperado que cada dose irá compreender de 1- 100 μg de antígeno de proteína, de modo opcional de 5 - 50 μg ou de 5- 25 μg . Por exemplo, doses de sacarídeos bacterianos são de 10-20 μg , 5-10 μg , 2,5- 5 μg ou de 1,2 - 5 μg do sacarídeo no conjugado.

As preparações de vacina da presente invenção podem ser usadas para proteger ou tratar um mamífero (por exemplo, um paciente humano) suscetível à infecção, através da administração da referida vacina através da mucosa ou de via sistêmica. Um paciente humano é, de modo opcional, um infante (abaixo de 12 meses), uma criança pequena (12-24, 12-16, ou 12-14 meses), uma criança (2-10), 3-8 ou 3- 5 anos), um adolescente (12-21, 12-20 ou 15-19 anos) ou um adulto. Estas administrações podem incluir injeção através de vias intramuscular, intraperitonal, intradérmica ou subcutânea; ou a administração através da mucosa aos tratos oral/alimentar, respiratório, ou geniturinário. A administração intranasal de vacinas para o tratamento de pneumonia ou otite média é preferido (pois o transporte nasofaríngeo de pneumococos pode ser mais efetivamente evitado, deste modo atenuando a infecção em seu estágio mais precoce). Embora a vacina da invenção possa ser administrada como uma dose única, os componentes da mesma podem ser também co-administrados, de modo conjunto, ao mesmo tempo ou em momentos diferentes (por exemplo, se os sacarídeos estiverem presentes em uma vacina, estes poderiam ser administrados separadamente no mesmo momento ou 1-2 semanas após a administração de uma vacina de proteína bacteriana para a coordenação ótima das respostas imunes, uma com relação à outra). Em adição a uma única via de administração, 2 vias diferentes de administração podem ser usadas. Por exemplo, os antígenos virais podem ser administrados por via ID (intradérmica), enquanto que as proteínas bacterianas podem ser administradas por via IM (intramuscular) ou

por IN (intranasal). Se os sacarídeos estiverem presentes, eles podem ser administrados por via IM (ou ID) e as proteínas bacterianas podem ser administradas por IN (ou ID). Em adição, as vacinas da invenção podem ser administradas por via IM para doses de base e IN para doses de reforço.

- 5 A preparação da vacina é descrita, de modo geral, em Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (Eds. Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York). A encapsulação dentro de lipossomas é descrita por Fullerton, Patente US 4. 235. 877.

10 Um outro aspecto da invenção consiste em um processo para a produção da composição imunogênica ou vacina da invenção, que compreende o estágio de misturar os sacarídeos MenA e MenC da invenção, produzidos através do método da invenção, em que MenW e MenY não foram produzidos de acordo com a invenção, e com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

- 15 Os termos "compreendendo", "compreendem" e "compreende" neste caso, de acordo com os inventores, são intencionados como sendo opcionalmente substituíveis pelos termos "consistindo de", "consistem de" e "consiste de", respectivamente, em cada caso.

20 Todas as referências ou pedidos de patente citados neste relatório de patente são incorporados a este, a título referencial.

- A invenção é ilustrada nos exemplos anexos. Os exemplos abaixo são executados usando técnicas convencionais, que são bem conhecidas e que constituem a rotina daqueles versados na arte, exceto quando descritos em detalhe de outro modo. Os exemplos são ilustrativos, 25 mas não limitam a invenção.

Exemplos:

Exemplo 1 - Preparação de conjugados de polissacarídeo

Exemplo 1a - Preparação de conjugados de polissacarídeo capsular MenA e MenC da invenção

Os conjugados MenC - TT foram produzidos usando polissacarídeos nativos (de mais do que 150 kDa, conforme medido por MALLS) ou foram ligeiramente microfluidizados. Os conjugados de MenA-TT foram produzidos usando ou polissacarídeo nativo ou polissacarídeo ligeiramente microfluidizado de mais do que 60 kDa, conforme medido pelo método de MALLS do Exemplo 2. O dimensionamento foi efetuado através de microfluidização usando um aparelho homogeneizador Emulsiflex C-50. Os polissacarídeos foram então filtrados através de um filtro de 0,2 µm.

De modo a conjugar o polissacarídeo capsular MenA ao toxóide do tétano através de um espaçador, foi usado o método que se segue. A ligação covalente do polissacarídeo e do espaçador (ADH) é executada através de química de acoplamento, através da qual o polissacarídeo é ativado, sob condições controladas, através de um agente de cianalação, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridínio (CDAP). O espaçador reage com o PS cianilado através de seus grupos hidrazino, de modo a formar uma ligação isouréia estável entre o espaçador e o polissacarídeo.

Uma solução de 10 mg/ml de MenA (pH 6,0) [3,5 g] foi tratada com uma solução recém preparada de 100 mg/ml de CDAP em acetonitrila/água (50/50 (v/v), de modo a que seja obtida uma razão de CDAP/MenA de 0,75 (p/p). Após 1,5 minutos, o pH foi elevado para o pH de 10,0. Três minutos após, o ADH foi adicionado de modo a obter uma razão de ADH/MenA de 8,9. O pH da solução foi diminuído para 8,75 e a reação prosseguiu durante 2 horas mantendo este pH (com a temperatura mantida a 25°C).

A solução de PSA_{AH} foi concentrada a um quarto de seu volume inicial e então diafiltrada com 30 volumes de NaCl 0,2 M usando uma membrana Filtron Omega com um corte de 10 kDa, e o produto retido foi filtrado.

Antes da reação de conjugação (condensação de

carbodiimida), a solução de TT purificada e a solução de PSA_{AH} foram diluídas, de modo a que fosse alcançada uma concentração de 10 mg/ml para PSA_{AH} e 10 mg/ml para TT.

5 EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) foi adicionado à solução de PS_{AH} (2 g de sacarídeo) de modo a alcançar uma razão final de 0,9 mg de EDAC/mg de PSA_{AH}. O pH foi ajustado para 5,0. O toxóide de tétano purificado foi adicionado com uma bomba peristáltica (em 60 minutos) de modo a alcançar 2 mg de TT/mg de PSA_{AH}. A solução resultante foi deixada 60 minutos em + 25°C, sob agitação, de modo a que fosse obtido um tempo de acoplamento final de 120 minutos. A solução foi
10 neutralizada através da adição de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 (1/10 do volume final) e deixada 30 minutos a + 25°C, e então durante a noite a de + 2°C a + 8°C.

O conjugado foi clarificado usando um filtro de 10 µm e foi
15 purificado usando uma coluna Sephacryl S400 HR (Pharmacia, Suécia). A coluna foi equilibrada em Tris- HCl 10 mM (pH 7,0) NaCl 0,075 M e o conjugado (aprox. 660 ml) foi carregado sobre a coluna (+ 2°C a + 8°C). O reservatório de eluição foi selecionado como uma função da densidade óptica a 280 nm. A coleta foi iniciada quando a absorção foi aumentada para 0,05. A
20 coleta foi continuada até que o Kd alcançasse 0,30. O conjugado foi esterilizado por meio de filtro a + 20°C, e então armazenado a de + 2°C a + 8°C. O conjugado resultante apresentou uma razão de polissacarídeo: proteína de 1:2 - 1:4 (p/p).

De modo a conjugar o polissacarídeo capsular MenC ao
25 toxóide de tétano através de um espaçador, foi usado o método que se segue. A ligação covalente do polissacarídeo e do espaçador (ADH) é executada através de uma química de acoplamento, através da qual o polissacarídeo é ativado sob condições controlada por um agente de cianilação, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridínio (CDAP). O espaçador

reage com o PS cianilado através de seus grupos hidrazino, de modo a formar uma ligação isouréia estável entre o espaçador e o polissacarídeo.

Uma solução de 20 mg/ml de MenC (pH 6,0) (3, 5 g) foi tratada com uma solução recém preparada de 100 mg/ml de CDAP em acetonitrila/água (50/50 (v/v) de modo a obter uma razão de CDAP/MenC de 1,5 (p/p). Após 1,5 minutos, o pH foi elevado para o pH de 10,0. Na ativação do pH, NaCl 5 M foi adicionado, de modo a que fosse alcançada uma concentração final de NaCl 2 M. Três minutos após, ADH foi adicionado, de modo a que fosse obtida uma razão de ADH/MenC de 8,9. O pH da solução foi diminuído para 8,75 e a reação prosseguiu durante 2 horas (retida a 25°C).

A solução de PSC_{AH} foi concentrada a um mínimo de 150 ml e então diafiltrada com 30 volumes de NaCl 0,2 M usando uma membrana Filtron Omega com um corte de 10 kDa, e o produto retido foi filtrado.

Antes da reação de conjugação, a solução de TT purificada e a solução de PSC_{AH} (escala de 2 g) foram diluídas em NaCl 0,2 M, de modo a alcançar uma concentração de 15 mg/ml para PSC_{AH} e de 20 mg/ml para TT.

O toxóide de tétano purificado foi adicionado à solução de PSC_{AH}, de modo a alcançar 2 mg de TT/mg de PSC_{AH}. O pH foi ajustado para 5,0. EDAC (16,7 mg/ml em Tris 0,1 M, pH 7,5) foi adicionado com uma bomba peristáltica (em 10 minutos), e modo a que fosse alcançada uma razão final de 0,5 mg de EDAC/mg de PSC_{AH}. A solução resultante foi deixada durante 110 minutos a + 25°C, sob agitação e regulação de pH, de modo a que fosse obtido um tempo de acoplamento final de 120 minutos. A solução foi então neutralizada através da adição de Tris- HCl 1 M, pH 9,0 (1/10 do volume final) e deixada durante 30 minutos a + 25°C e então durante a noite a de + 2°C a + 8° C.

O conjugado foi clarificado usando um filtro de 10 µm e foi purificado usando uma coluna Sephacryl S 400 HR (Pharmacia, Suécia). A coluna foi equilibrada em Tris- HCl 10 mM (pH 7,0), NaCl 0,075 M e o

conjugado (aproximadamente 460 ml) foi carregado sobre a coluna (+ 2°C a + 8°C). O reservatório de eluição foi selecionado como uma função da densidade óptica a 280 nm. A coleta foi iniciada quando a absorbância aumentou para 0,05. A coleta continuou até que o Kd alcançasse 0,20. O conjugado foi esterilizado através de filtro a + 20°C, e então armazenado a + 2°C a + 8°C. O conjugado resultante tinha uma razão de polissacarídeo: proteína de 1:2 - 1:4 (p/p).

Vários experimentos com a adição de EDAC ao longo de 10-45 minutos foram executados – em cada caso resultou a boa qualidade de conjugados de MenC. Se no entanto, o veículo de TT fosse adicionado por fim lentamente à mistura de MenC- ADH + EDAC, esta é conduzida a um gel - um conjugado que não poderia ser purificado.

Foram também executados experimentos mediante a adição de EDAC de uma única vez à reação, mas a razão final de TT/PS (2,7/1) (p/p) do conjugado foi inferior àquela obtida para o conjugado através da reação, em que EDAC foi adicionado durante 10 minutos (3,3/1); além disso, a antigenicidade de α TT e de α PS foram ambas inferiores àquelas medidas com relação ao conjugado produzido através da reação, em que EDAC foi adicionado durante 10 minutos.

Observação quanto ao % de derivação aproximado dos polissacarídeos

MenCAH: Após o tratamento de CDAP com ADH, cerca de 3,47% dos grupos hidroxila foram derivados com ADH (com uma estimação e dois grupos hidroxila disponíveis por subunidade de repetição).

Para MenA: cerca de 11, 5% de grupos hidroxila derivados com ADH (considerando que existe apenas um grupo hidroxila disponível por unidade de repetição).

Exemplo 1b - Preparação de conjugado de polissacarídeo PS3 capsular pneumocócico

1) Processo PS03- TT_{AH}: PS03- TT_{AH}208

Dimensionamento através de Emulsiflex

PS foi pesado com uma base de 10% de conteúdo de umidade teórico. O PS nativo foi dissolvido durante a noite em NaCl 2 M em uma
5 concentração inicial de 3 mg/ml. Antes do dimensionamento, a solução de PS nativo foi clarificada em filtro de corte de 5 μ m.

Um aparelho de homogeneização EMULSIFLEX C- 50 foi usado para reduzir o peso molecular e a viscosidade do polissacarídeo antes do estágio de ativação. A eficiência do dimensionamento depende da pressão
10 do circuito, da pressão de alimentação do êmbolo e do número de ciclos total. De modo a aperfeiçoar a eficiência do dimensionamento (e conseqüentemente reduzir o número total de ciclos), a célula de homogeneização de Emulsiflex foi substituída por uma célula com uma geometria fixa (Microfluidics F20Y – câmara de interação de 0, 75 μ m). O escopo do dimensionamento foi o de
15 reduzir o peso molecular e a viscosidade do PS sem um decréscimo crítico de sua antigenicidade.

A redução de tamanho foi efetuada em 6000 ± 500 psi e seguida em- processo por uma medição da viscosidade. O dimensionamento foi interrompido quando o objetivo de $2,0 \pm 0,2$ cp foi alcançado.

20 **Filtração de PS dimensionado em 0,22 μ m**

O PS dimensionado foi filtrado em uma membrana Millipak 40 (corte de 0,22 μ m) em uma taxa de fluxo de 10 ml/minuto.

Derivação de TT

O estágio de derivação foi executado a 25°C, sob condições de
25 agitação, em um banho de água controlado por T°. TT foi diluído em NaCl 0,2 M, de modo a que seja obtida uma concentração final de TT de 25 mg/ml. O ADH foi adicionado em forma sólida à solução de TT, de modo a que fosse alcançada uma concentração final de 0,2 M. Após a dissolução de ADH completa, a solução foi ajustada a um pH de 6, 2 +/- 0,1 com HCl.

EDAC foi então adicionado à solução de TT/ADH, de modo a que fosse alcançada uma concentração final de 0,02 M. O pH foi então ajustado para 6, 2 +/- 0,1 com HCl e mantido sob regulação de pH durante 1 hora.

5 Após o estágio de derivação, o pH foi elevado para o pH de 9,5 com NaOH, de modo a interromper a reação. A solução foi deixada durante 2 horas sob regulação de pH antes do estágio de diafiltração.

Diafiltração

10 Derivado TT_{AH} foi diafiltrado de modo a remover os subprodutos ADH e EDAC. A diafiltração foi executada em uma membrana centramate (0,09 m², corte de 10 kDa). A solução foi dialisada contra 20 volumes de NaCl 0, 2 M.

15 A monitoração do estágio de diafiltração foi executada através de uma quantificação de ADH (ensaio de TNBS) no permeado após 5, 10, 15 e 20 volumes de diafiltração.

Filtração em 0, 22 µm

TT_{AH} foi finalmente filtrado em uma membrana de corte de 0, 22 µm (Millipack 40) em uma taxa de fluxo de 10 ml/minuto. O TT_{AH} filtrado foi então armazenado a -70°C.

20 Conjugado PS3- TT_{AH}

As condições do processo foram as que se seguem:

25 Uma concentração inicial de PS3 de 2 mg/ml em NaCl 2 M, uma razão de TT_{AH}/PS3 inicial de 1, 5/1 (p/p), uma concentração de EDAC de 0,5 mg/mg de PS, e uma concentração de TT de 10 mg/ml em NaCl 0,15 M.

50 mg de PS3 foram diluídos em NaCl 2 M, de modo a obter uma concentração de PS final de 2 mg/ml. A solução de TT_{AH} purificada foi diluída em NaCl 0,2 M, de modo a que fosse alcançada uma concentração de 10 mg/ml. A solução de PS3 foi ajustada para o pH 5 com HCl.

EDAC foi adicionado em forma sólida à solução de PS3, de modo a alcançar uma concentração final de 0,5 mg de EDAC/mg de PS. O pH foi ajustado para $5,0 \pm 0,05$ com HCl e TT_{AH} foi adicionado manualmente em 11 minutos (alíquotas/minuto). A solução resultante foi incubada durante 109 minutos a + 25°C, com agitação e regulação de pH, de modo a obter um tempo de acoplamento final de 120 minutos. Então, a solução foi neutralizada através da adição de Tris- HCl 1 M, em pH de 7,5, e deixada 30 minutos a - 25°C. O conjugado foi finalmente clarificado em uma membrana de 5 µm e injetado em uma coluna Sephacryl S400HR.

10 2) Processo PS03- TT_{AH}- TT215

Dimensionamento através de Emulsiflex

Como acima.

Filtração de PS dimensionado em 0, 22 µm

Como acima.

15 Derivação de PS3

O estágio de derivação foi executado a 25°C, sob agitação contínua, em um banho de água controlado por T°. O PS3 foi diluído em NaCl 2M, de modo a que fosse obtida uma concentração de PS final de 3 mg/ml. A solução de PS foi ajustada para um pH de 6,0, antes da adição de CDAP (0, 20 25 mg/mg de PS, dissolução a 100 mg/ml em uma mistura de acetonitrila/WFI). O pH foi aumentado para um pH de 9,5 com NaOH, antes da adição de ADH (8,9 mg de ADH/mg de PS, dissolução a 100 mg/ml em NaCl 0,2 M). O pH foi mantido em 9,5 e regulado durante 60 minutos. O percentual de derivação correspondeu a 2,4 % (2,4 mg de ADH/100 mg de 25 PS). Este pode ser medido com técnicas conhecidas: TNBS para estimar ADH; e DMAB ou resorcinol (Monsigny et al. (1988), Anal. Biochem. 175, 525 – 530) para a quantificação de PS. Neste caso, a dosagem de TNBS foi de 228 µg/ml e a dosagem de PS: 5250 µg/ml.

Dado ao fato de que o MW de ADH é de 174, 2, e o Mw da

unidade de repetição de PS3 é de 338,27 (tendo 1 grupo COOH e 4 grupos OH) existem 1,3 μ moles de ADH/15,52 μ mol de unidade de repetição ou 1,3 μ moles de ADH/62,08 μ mol de grupo hidroxila reativo. 2,09% de grupos hidroxila de PS3 eram grupos hidroxila modificados com ADH.

5 Diafiltração

O derivado de PS3_{AH} foi diafiltrado de modo a remover os subprodutos de ADH e CDAP não-reagidos. A diafiltração foi executada em uma membrana de UFP – 30-C- H24LA (42 cm², corte de 30 kDa). A solução foi dialisada contra 20 volumes de NaCl 0,2 M.

10 A monitoração do estágio de diafiltração foi executada através de uma quantificação de ADH (ensaio de TNBS) no permeado após 5, 10, 15 e 20 volumes de diafiltração.

Filtração em 0,22 μ m

15 PS_{AH} foi finalmente filtrado em uma membrana de corte de 0,22 μ m (Millipack 40) em uma taxa de fluxo de 10 ml/minuto. O PS3_{AH} filtrado foi então armazenado a 4° C.

Conjugado de PS3_{AH}-TT

As condições do processo foram as que se seguem:

20 Uma concentração de PS3 inicial de 2 mg/ml em NaCl 2 M, uma razão inicial de TT/PS3_{AH} de 1,5/1 (p/p), uma concentração de EDAC de 0,5 mg/mg de PS, e uma concentração de TT de 10 g/ml em NaCl 0,15 M.

50 mg de PS3_{AH} foram diluídos em NaCl 0,2 M, de modo a obter uma concentração de PS final de 2 mg/ml. A solução de TT purificada foi diluída em NaCl 0,2 M, de modo a alcançar uma concentração de 10 25 mg/ml. A solução de PS3_{AH} foi ajustada para o pH 5 com HCl.

EDAC foi adicionado em forma sólida à solução de PS3_{AH}, de modo a alcançar uma concentração final de 0,5 mg de EDAC/mg de PS. O pH foi ajustado para 5,0 $\pm$ 0,05 com Hcl e TT foi adicionado em 10 minutos, usando uma bomba peristáltica. A solução resultante foi incubada durante 110

minutos a + 25°C, com agitação e regulação de pH, de modo a obter um tempo de acoplamento final de 120 minutos. Então, a solução foi neutralizada através da adição de Tris- HCl 1 M, em pH de 7,5, e deixada 0 minutos a + 25°C. O conjugado foi finalmente clarificado em uma membrana de 5 µm e

5 injetado em uma coluna Sephacryl S00 HR.

3) Processo de PS03_{AH}-TT: PS3_{AH}-TT217

Dimensionamento através de Emulsiflex

Como acima.

Filtração de PS dimensionado em 0,22 µm

10 Como acima.

Derivação de PS3

Como para o conjugado 215.

Filtração em 0,22 µm

Como para o conjugado 215.

15 Conjugado de PS3_{AH}-TT

As condições do processo foram as que se seguem:

Uma concentração de PS3 inicial de 2 mg/ml em NaCl 2M, uma razão de TT/PS3_{AH} inicial de 1, 5/1 (p/p), uma concentração de EDAC de 0,5 mg/mg de PS, e uma concentração de TT de 10 mg/ml em NaCl 0,15

20 M.

50 mg de PS3_{AH} foram diluídos em NaCl 0,2 M, de modo a obter uma concentração de PS final de 2 mg/ml.

A solução de TT purificada foi diluída em NaCl 0,2 M, de modo a alcançar uma concentração de 10 mg/ml.

25 As soluções de PS3_{AH} e de TT foram misturadas e ajustadas para o pH5 com HCl.

EDAC foi dissolvido em um tampão Tris 1 M, pH 7. 40 µl de EDAC foram adicionados a cada minuto (10 minutos para alcançar a razão de EDAC/PS (0,5 mg de EDAC/mg de PS)). A solução resultante foi incubada

durante 110 minutos a + 25°C, sob agitação e regulação de pH, de modo a obter um tempo de acoplamento final de 120 minutos. Então a solução foi neutralizada através da adição de Tris-HCl 1 M, pH de 7,5, e deixada durante 30 minutos a + 25°C. O conjugado foi finalmente clarificado em uma membrana de 5 µm e injetado em uma coluna Sephacryl S 400 HR.

4) Processo de PS03_{AH}-TT: PS3_{AH}-TT218

Dimensionamento através de Emulsiflex

Como acima.

Filtração de PS dimensionado em 0,22 µm

Como acima.

Derivação de PS3

O estágio de derivação foi executado a 25°C, com agitação contínua, em um banho de água controlado por T°. PS3 foi diluído em NaCl 2M, de modo a obter uma concentração de PS final de 3 mg/ml. EDAC foi adicionado em forma sólida, de modo a alcançar uma razão de EDAC/PS de 0,1 mg/mg de PS. Após a dissolução completa, o pH da solução foi ajustado em 5. ADH (8,9 mg ADH/mg PS, dissolução em 100 mg/ml de NaCl 0,2 M) foi então adicionado, usando uma bomba peristáltica em 44 minutos (apesar de um tal excesso de ADH estar presente, a adição direta também estaria OK). O pH foi mantido em 5,0 +/- 0,1 e regulado durante 120 minutos (44' + 76'). A reação foi interrompida pelo aumento do pH para 7,5 usando hidróxido de sódio. O percentual de derivação correspondeu a 3, 7% (mg ADH/mg PS). A dosagem de TNBS foi de 220 µg/ml e a dosagem de PS foi de 5902 µg/ml, havendo, deste modo, 1,26 µmoles de ADH/17, 44 µmol de unidade de repetição (= µmol de grupo COOH reativo). Deste modo, 7,22 % de grupos carboxila de PS3 eram grupos COOH modificados com ADH.

Diafiltração

O derivado de PS3_{AH} foi diafiltrado de modo a remover os subprodutos ADH e EDAC não-reagidos. A diafiltração foi executada em

uma membrana UFP-30-C-H24LA (42 cm², corte de 30 kDa). A solução foi dialisada contra 23 volumes de NaCl 0,2 M.

5 A monitoração do estágio de diafiltração foi executada pela quantificação de ADH (ensaio de TNBS) no permeado após 5, 10, 15 e 20 volumes de diafiltração.

Filtração em 0,22 µm

PS_{AH} foi finalmente filtrado em uma membrana de corte de 0,22 µm (Millipack 40) em uma taxa de fluxo de 10 ml/minuto. O PS_{3AH} filtrado foi então armazenado a 4°C.

10 **Conjugado de PS_{3AH}-TT**

As condições do processo foram as que se seguem:

Uma concentração inicial de PS_{3AH} de 2 mg/ml em NaCl 2 M, uma razão inicial de TT/PS_{3AH} inicial de 1,5/1 (p/p), uma concentração de EDAC de 0,5 mg/mg de PS, e uma concentração de TT de 10 mg/ml em NaCl 15 0,15 M.

50 mg de PS_{3AH} foram diluídos em NaCl 0, 2 M, de modo a obter uma concentração de PS final de 2 mg/ml.

A solução de TT purificada foi diluída em NaCl 0,2 M, de modo a alcançar uma concentração de 10 mg/ml.

20 As soluções de PS_{3AH} e de TT foram misturadas de um modo conjunto.

O pH foi ajustado para $5,0 \pm 0,05$ com HCl e EDAC foi manualmente adicionado em 10 minutos (partes-alíquotas iguais adicionadas a cada minuto). A solução resultante foi incubada durante 110 minutos a + 25°C com agitação e regulação de pH, de modo a obter um tempo de acoplamento final de 120 minutos. Então, a solução foi neutralizada através da adição de Tris-HCl 1 M, pH de 7,5 e deixada 30 minutos a + 25°C. O 25 conjugado foi finalmente clarificado em uma membrana de 5 µm e injetado em uma coluna Sephacryl S400 HR.

Conclusões:

Diferentes conjugados foram produzidos usando química de carbodiimida no estágio de conjugação. O último componente adicionado na solução da reação pode ser ou a proteína TT ou o reagente EDAC. O tempo de adição pode ter um efeito sobre os conjugados resultantes.

Conjugados de PS_{3AH}TT215 & 217:

Os mesmos componentes e condições foram usados para preparar ambos os conjugados. O modo pelo qual o último componente adicionado foi diferente. O conjugado PS_{3AH}TT217 conduziu a um produto, que satisfaz os critérios *in vitro*. Este foi produzido através da adição de EDAC em 10 minutos.

O conjugado PS_{3AH}TT215, no entanto, não pôde ser filtrado em uma membrana estéril. Para este, o último componente adicionado no meio da reação foi o TT (em 10 minutos).

As razões de TT/PS foram altamente diferentes para ambos os conjugados (0,98/1 contra 0,50/1). Se EDAC for adicionado primeiramente ao PS_{3AH} (tendo ambos os grupos reativos amino e carboxila), isto pode conduzir a uma intra- reticulação dos grupos hidrazina e carboxílicos presentes no polissacarídeo, e isto poderia conduzir a um conjugado mais reticulado, com uma razão final mais fraca após a adição de TT em 10 minutos.

Este efeito não é observado para o conjugado PS_{3AH}TT217. A incorporação de TT operou melhor através da adição de EDAC em 10 minutos, talvez devido à uma intra- reticulação inferior, e a uma melhor intra- reticulação entre os grupos hidrazina dos grupos PS_{3AH} e carboxílico da proteína.

No caso do conjugado 218, como a derivação de EDAC de PS3 apenas deriva parcialmente o polissacarídeo (para manter a maior parte dos epítomos de polissacarídeos intactos), novamente ambos os grupos reativos amino e carboxila estão presentes, sendo por isto que a adição lenta

de EDAC em um estágio de conjugação final é também benéfica.

- 5 A adição lenta de TT no estágio de conjugação final foi benéfica (no entanto) para o conjugado 208, em que TT era derivado de ADH (e compreende grupos amino e carboxila), enquanto que PS3 foi deixado com os grupos -OH e -COOH reativos nativos, como parte de sua subunidade de repetição. A adição de EDAC a PS3 não apresentou o efeito de reticulação acima, e a adição lenta do conjugado forneceu TT derivado, com boas características in vitro – vide abaixo.

Caracterização in vitro:

Conj.	Derivação/química	Conjugação/química	Adição do componente final
208	TT/ADH→EDAC	OS-TT _{AH} →EDAC	TT _{AH} adicionado em 11 minutos
215	PS3/ADH→CDAP	PSAH-TT→EDAR	TT adicionado em 10 minutos
217	PD3/ADH→CDAP	PSAH-TT→EDAC	EDAC adicionado em 10 minutos
218	PS3/ADH→EDAC	PSAH-TT→EDAC	EDAC adicionado em 10 minutos

Conj.	PS	[PS] (mg/ml)	[TT] (mg/ml)	Relação In. TT/PS (v/v)	[EDAC] (mg/mg OS)	Tempo de copulação (min)
208	C6E02	2,0	10 (TT _{AH}) _{bomba}	1,5/1	0,5/1	120
215	3 _{AH} 001 (CDAP)	2,0	10 bomba	1,5/1	0,5/1	120
217	3 _{AH} 001 (CDAP)	2,0	10	1,5/1	0,5/1 (Frações)	120
218	3 _{AH} 002 (EDAC)	2,0	10	1,5/1	0,5/1 (Frações)	120

Conj.	Relação F. TT/PS (v/v)	Rend. de OS rec. (%)	Rend. filtr. rec. (%)	PS livre (%)	αPS/αPS (%) Antigenicidade	αTT/αPS (%) Antigenicidade
208	1,84/1	69	95	10,2	99	103 100*
215	0,50/1	17	27	-	-	-
217	0,98/1	66	100	0,7	17	103 100*
218	0,88/1	74	101	11,0	34	222 216*

- 10 * relativo ao conjugado 208.

Exemplo 1c- preparação do conjugado de polissacarídeo S. typhi Vi da invenção

Dimensionamento através de Emulsiflex

PS foi pesado em uma base de 15% do conteúdo de umidade teórico. O PS nativo é dissolvido durante a noite em WFI, em uma concentração inicial de 7 mg/ml. Antes do dimensionamento, a solução de PS nativo é clarificada em um filtro de corte de 10 μm , em uma taxa de fluxo de 50 ml/minuto. Um aparelho de homogeneização EMULSIFLEX C- 50 foi usado para reduzir o peso molecular e a viscosidade do polissacarídeo antes do estágio de ativação. A eficiência do dimensionamento depende da pressão do circuito, da pressão de alimentação do êmbolo e do número de ciclos totais. De modo a aperfeiçoar a eficiência de dimensionamento (e conseqüentemente reduzir o número total de ciclos), a célula de homogeneização de Emulsiflex foi substituída por uma célula com uma geometria fixa (câmara de interação Microfluids F20Y - 0,75 μm). O escopo do dimensionamento é o de reduzir o peso molecular e a viscosidade do PS, sem um decréscimo crítico de sua antigenicidade.

A redução de tamanho foi realizada a 15000 ± 500 psi e seguido em – processo por uma medição de viscosidade. O dimensionamento é interrompido quando o alvo de $5,0 \pm 0,3$ cp é alcançado.

Filtração de PS dimensionado em 0,22 μm

PS dimensionado é filtrado em uma membrana Millipak 40 (corte de 0,22 μm), em uma taxa de fluxo de 10 ml/minuto. O PS dimensionado filtrado é armazenado a -20°C .

Derivação do polissacarídeo Vi

1,5 g de PS Vi dimensionado foi dissolvido a 25°C em EPI sob agitação (5 mg/ml)(13,35 g de ADH (8,9 mg ADH/mg PS) é adicionado à solução de PS. Após a dissolução completa, o pH foi ajustado para o pH de 5, $0 \pm 0,05$ com HCl 1 N. EDAC (0,1 mg/mg PS) foi adicionado em uma forma sólida. A solução foi deixada durante 60 minutos a 25°C . Então, a solução foi neutralizada através da adição de Tris- HCl em pH de 7,5 e deixada pelo

menos 30 minutos a 25°C (máximo de 2 horas). O nível de derivação foi estimado como sendo de 4, 55% usando a dosagem de TNBS (mg ADH/100 mg de PS). A dosagem foi de 200 µg/ml e a dosagem de PS foi de 4034 µg/ml; deste modo, 0,0696 µmoles de ADH/16, 46 µmol de unidade de repetição (Mw 245). 1,3 µmoles de ADH/16,46 µmol de grupo COOH reativo em Vi, deste modo 7% dos grupos COOH Vi eram grupos COOH modificados com ADH.

Diafiltração

O derivado PSV_{AH} foi diafiltrado de modo a remover os subprodutos ADH e EDAC não -reagidos. A diafiltração foi executada em uma membrana centramate (0,09 m², corte de 10 kDa). A solução foi dialisada contra 20 volumes de NaCl 0,2 M. A monitoração do estágio de diafiltração foi efetuada pela quantificação de ADH (ensaio de TNBS) no permeado após 3, 5, 10 e 20 volumes de diafiltração.

Filtração em 0,22 µm

PSVi_{AH} foi finalmente filtrado em uma membrana de corte de 0, 22 µm (Millipack 40) em uma taxa de fluxo de 10 ml/minuto. O PSViAH foi armazenado em + 2/+ 8 °C durante um máximo de 4 dias.

Conjugados PSVi_{AH}-TT

As condições do processo foram as que se seguem:

Uma concentração de PSViAH inicial de 2 mg/ml em NaCl 0,2 M, uma razão inicial de TT/PSViAH de 2,5/1 (p/p), uma concentração de EDAC de 0, 25 mg/mg de PS e uma concentração de TT de 10 mg/ml em NaCl 0,2 M.

1 g de PSVi_{AH} foi diluído em NaCl 0, 2 M, de modo a obter uma concentração de PS final de 2 mg/ml (dosagem de ácido urônico). A solução de TT purificada foi diluída com NaCl 0,2 M de modo a alcançar uma concentração de 10 mg/ml.

TT foi adicionado à solução de PSVi_{AH}, de modo a alcançar

uma razão final de 2,5 mg de TT/mg de PS. O pH é ajustado para $5,0 \pm 0,05$ com HCl 1 N. A solução de EDAC (7,5 mg/ml em Tris 0,1 M, pH de 7,5) foi então adicionada (em 10 minutos, com uma bomba peristáltica) de modo a alcançar 0,25 mg de EDAC/mg de PSVi_{AIH}. A solução resultante foi incubada durante 50 minutos, a + 25°C, com agitação e regulação de pH, de modo a obter um tempo de acoplamento final de 60 minutos. Então, a solução foi neutralizada pela adição de Tris-HCL 1 M, pH de 7,5 e deixada 30 minutos a + 25°C. O conjugado foi transferido a 4°C e é deixado sob agitação contínua lenta antes do estágio de cromatografia.

10 Purificação

Antes da eluição em Sephacryl S400 R, o conjugado foi clarificado usando um filtro Kleenpak de 10 µm. A taxa de fluxo foi fixada em 100 ml/minuto. O conjugado foi então injetado em Sephacryl S 400HR e o reservatório de coleta foi baseado em um valor kd. O critério que se segue foi usado para a coleta do reservatório: a coleta foi iniciada de OD = 0,05 a 280 nm, e terminada quando kd = 0,22.

Filtração por esterilização

Antes da filtração, a massa foi trazida de volta à temperatura ambiente. Então, o conjugado foi filtrado em uma membrana de esterilização Opticap 4". A taxa de fluxo foi fixada em 30 ml/minuto.

Dados analíticos

O conjugado resultante possuía uma razão de TT/PS final (p/p) de 2,44/l, um conteúdo de PS livre de 3,7% e uma antigenicidade de αPS/αPS de 58%.

25 Exemplo 1 d- Preparação de outros conjugados de polissacarídeo

A ligação covalente do polissacarídeo PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) a TT foi executada através de química de acoplamento desenvolvida por Chu et al. (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). O polissacarídeo PRP de Hib foi ativado através da adição de CNBr e

incubação em pH de 10,5 durante 6 minutos. O pH foi abaixado para o pH de 8,75 e diidrazida de ácido adípico (ADH) foi adicionada e a incubação continuada durante um período adicional de 90 minutos. O PRP ativado foi acoplado ao toxóide de tétano purificado através de condensação de carbodiimida usando 1- etil-3-(3- dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDAC). EDAC foi adicionado ao PRP ativado de modo a alcançar uma razão final de 0,6 mg de EDAC/mg de PRP ativado. O pH foi ajustado para 5,0 e o toxóide de tétano purificado foi adicionado de modo a alcançar 2 mg de TT/mg de PRP ativado. A solução resultante foi deixada durante três dias com agitação branda. Após a filtração através de uma membrana de 0,45 µm, o conjugado foi purificado em uma coluna Sephacryl S500 HR (Pharmacia, Suécia) equilibrada em NaCl 0,2 M.

Os conjugados MenC- TT foram produzidos usando polissacarídeos nativos (de acima de 150 kDa como medido por MALLS) ou foram ligeiramente microfluidizados. Os conjugados MenA- TT foram produzidos usando ou polissacarídeo nativo ou polissacarídeo ligeiramente microfluidizado de mais do que 60 kDa conforme medido pelo método de MALLs do Exemplo 2. Os conjugados MenW e MenY-TT foram produzidos usando polissacarídeos dimensionados de cerca de 100- 200 kDa, conforme medido por MALLS (vide Exemplo 2). O dimensionamento foi efetuado através de microfluidização usando um aparelho de homogeneização Emulsiflex C-50. Os polissacarídeos foram então filtrados através de um filtro de 0,2 µm.

A ativação e o acoplamento direto foram executados conforme descrito na WO 96/29094 e W 00/56360. Em resumo, o polissacarídeo em uma concentração de 10-20 mg/ml em NaCl 2M, pH de 5,5- 6,0 foi misturado com solução de CDAP (100 mg/ml recém preparado em acetonitrila/Wfi, 50/50) em uma razão final de CDAP/polissacarídeo de 0,75/1 ou 1,5/1. Após 1,5 minutos, o pH foi aumentado com hidróxido de sódio para o pH de 10,0.

Após três minutos, o toxóide de tétano foi adicionado de modo a que fosse alcançada uma razão de proteína/polissacarídeo de 1,5/1 para MenW, 1,2/1 para MenY, 1,5/1 para MenA ou 1,5/1 para MenC. A reação foi continuada durante uma a duas horas.

- 5 Após o estágio de acoplamento, glicina foi adicionada em uma razão final de glicina/PS (p/p) de 7,5/1 e o pH foi ajustado para o pH de 9,0. A mistura foi deixada durante 30 minutos. O conjugado foi clarificado usando um filtro Kleenpak de 10 µm e foi então carregado sobre uma coluna Sephacryl S400HR, usando um tampão de eluição de NaCl 150 mM, 10 mM ou 5 mM Tris em pH de 7, 5. Os lotes clínicos foram filtrados em uma membrana de esterilização Opticap 4. Os conjugados resultantes tinham uma razão média de polissacarídeo: proteína de 1: 1 – 1: 5 (p/p).

Exemplo 2 - Determinação do peso molecular usando MALLS

- Os detectores foram acoplados a uma coluna e exclusão de tamanho de HPLC, a partir da qual as amostras foram eluídas. Por um lado, o detector de dispersão luminosa mediu as intensidades luminosas dispersadas em 16 ângulos pela solução macromolecular e, por outro lado, um refratômetro interferométrico, colocado em linha, permitiu a determinação da quantidade de amostra eluída. A partir destas intensidades, o tamanho e a forma das macromoléculas em solução pode ser determinado.

O peso molecular médio em peso (Mw) é definido como a soma dos pesos de todas as espécies, multiplicado pelo seu respectivo peso molecular e dividido pela soma dos pesos de todas as espécies.

- a) Peso molecular médio em peso: Mw

$$M_w = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

- 25 b) Peso molecular médio numérico: Mn

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

- c) Raio quadrado médio da raiz: Rw e R²w são o raio quadrado

médio definido por:

$$R^2_w \text{ ou } (r^2)_w = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i}$$

(m_i é a massa de um centro de dispersão i e r_i é a distância entre o centro de dispersão i e o centro de gravidade da macromolécula).

d) A polidispersividade é definida como a razão M_w/M_n .

5 Os polissacarídeos meningocócicos são analisados através de MALLS pela sua carga sobre colunas de HPLC (TSKG6000 e 5000PWxl), usadas em combinação. 25 μ l do polissacarídeo foram carregados sobre a coluna e foram eluídos com 0,75 ml de água filtrada. Os polissacarídeos são detectados usando um detector de dispersão luminosa (Wyatt Dawn DSP, 10 equipado com um laser de argônio de 10 mW a 488 nm) e um refratômetro interferométrico (Wyatt Otilab DSP equipado com uma célula P100 e um filtro vermelho a 498 nm).

As polidispersividades do peso molecular e as recuperações de todas as amostras foram calculadas pelo método de Debye usando um ajuste 15 polinomial da ordem de 1 polegada no software Astra 4.72.

Exemplo 3 – Ensaio clínico determinando o efeito de um agente de ligação em MenA em uma vacina de conjugado MenACWY

Uma única dose de formulações diferentes da vacina MenACWY foi administrada a adolescentes de 15-19 anos em 5 grupos de 25 20 pacientes em um ensaio aleatório a 1:1:1:1:1. As formulações testadas foram:

F1- MenACWY conjugado ao toxóide do tétano com o conjugado menA contendo um espaçador AH (ADH) (produzido de acordo com o Exemplo 1) - 5/5/5/5 μ g

F2- MenACWY conjugado ao toxóide do tétano com o 25 conjugado MenA contendo um espaçador AH (produzido de acordo com o Exemplo 1)- 2, 5/5/2,5/2, 5 μ g

F3 -MenACWY conjugado ao toxóide do tétano, com o conjugado MenA contendo um espaçador AH (produzido de acordo com o

Exemplo 1) - 5/5/2, 5/2, 5 µg

F4- MenACWY conjugado ao toxóide do tétano sem espaçador em qualquer conjugado - 5/5/5/5/µg

Grupo de Controle - Mencevax™ ACWY

5 No dia 30 após a inoculação, uma amostra de sangue foi tomada a partir dos pacientes.

As amostras de sangue foram usadas para determinar o percentual de respostas de SBA- MenA, SBA- MenC, SBA- MenW 135 e SBA-MenY, um mês após a dose de vacina. Uma resposta de vacina foi definida como 1) para pacientes inicialmente soro negativos – uma titulação de anticorpo pós- vacinação $\geq 1/32$ em 1 mês ou 2) para pacientes inicialmente soropositivos – titulação de anticorpo de ≥ 4 vezes a titulação de anticorpo pré-vacinação.

Resultados:

15 Como apresentado na Tabela abaixo, o uso de um espaçador no conjugado MenA levou a uma resposta imune aumentada contra MenA. O percentual de respostas foi aumentado de 66% a 90-95% quando o espaçador AH foi adicionado. Isto foi refletido em um aumento em SBA GNT a partir de 4335 para 10 000 e em um aumento de GMC de 5 para 20-40. De modo
20 surpreendente, o uso de um espaçador AH também conduziu a uma resposta imune aumentada contra MenC, tal como observado por um aumento no percentual de respostas e um aumento em SBA GMT. Um aumento poderia ser também observado em SBA-GMT contra MenY (6742 – 7122) e contra MenW (4621 – 5418) quando um espaçador foi introduzido.

	% SBA MenA respondentes	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	90.9	9805	20.38
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	75	8517	29.5
F3 5AH/5/2.5/2.5	95.5	10290	47.83
F4 5/5/5/5	66.7	4335	5.46
Mencevax™	85.7	8022	27.39
Formulação	% SBA MenC respondentes	SBA-MenC GMT	Anti-PSC GMC µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	69.6	3989	12.11
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	81.8	3524	12.78
F3 5AH/5/2.5/2.5	81.8	3608	8.4
F4 5/5/5/5	73.9	2391	8.84
Mencevax™	90.0	5447	38.71
Formulação	% SBA MenW respondentes	SBA-MenW GMT	Anti-PSW GMC µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	95	5418	9.65
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	85	4469	14.55
F3 5AH/5/2.5/2.5	95.5	4257	6.39
F4 5/5/5/5	95.5	4621	10.7
Mencevax™	86.4	2714	13.57
Formulação	% SBY MenY respondentes	SBA-MenY GMT	Anti-PSY GMC µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	91.3	7122	16.3
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	87.5	5755	12.52
F3 5AH/5/2.5/2.5	80	5928	8.88
F4 5/5/5/5	91.3	6742	13.88
Mencevax™	91.7	4854	21.02

Exemplo 4- Ensaio clínico determinando o efeito de um agente de ligação em conjugados MenA e MenC em uma vacina de conjugado MenACWY

Uma única dose de diferentes formulações da vacina MenACWY foi administrada a adolescentes de 15-19 anos em 5 grupos de 25 pacientes em um ensaio aleatório a 1:1:1:1:1. As formulações testadas foram:

F1- MenACWY conjugado a toxóide do tétano com os conjugados MenA e MenC contendo um espaçador AH (produzido de acordo com o Exemplo 1) -2,5/2,5/2,5/2,5 µg

F2 – MenACWY conjugado a toxóide do tétano, com os conjugados MenA e MenC contendo um espaçador AH (produzido de acordo

com o Exemplo 1) – 5/5/2,5/2,5 µg

F3- MenACWY conjugado ao toxóide do tétano, com os conjugados MenA e MenC contendo um espaçador AH (produzido de acordo com o Exemplo 1) - 5/5/5/5 µg

5 F4- MenACWY conjugado ao toxóide do tétano, com o conjugado MenA contendo um espaçador AH (produzido de acordo com o Exemplo 12) - 5/5/5/5 µg

No dia 30 após a inoculação, uma amostra de sangue foi tomada a partir dos pacientes.

10 As amostras de sangue foram usadas para determinar o percentual de respostas de SBA-MenA, SBA- MenC, SBA-MenW 135 e SBA-MenY, um mês após a dose da vacina. Uma resposta de vacina foi definida como 1) para pacientes inicialmente soro negativos - uma titulação de anticorpo pós- vacinação $\geq 1/32$ no mês 1 ou 2) para pacientes inicialmente soropositivos - titulação de anticorpo de ≥ 4 vezes a titulação de anticorpo de pré- vacinação.

Resultados

Formulação	% SBA MenA respondentes	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/ml ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	75	8417	20.23
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	72	6299	16.07
F3 5AH/5AH/5/5	87	9264	27.26
F4 5AH/5/5/5	77.3	9632	20.39

Mencevax™	78.3	8284	12.93
Formulação	% SBA MenC respondentes	SBA-MenC GMT	Anti-PSC GMC µg/ml ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	88	3619	12.82
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	88	2833	13.32
F3 5AH/5AH/5/5	95.8	4329	13.13
F4 5AH/5/5/5	95.8	1943	7.65
Mencevax™	91.7	1567	16.55
Formulação	% SBA MenW respondentes	SBA-MenW GMT	Anti-PSW GMC µg/ml ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	100	5656	7
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	96	4679	5.4
F3 5AH/5AH/5/5	91.3	4422	4.45
F4 5AH/5/5/5	88	4947	7.67
Mencevax™	96	3486	11.93
Formulação	% SBY MenY respondentes	SBA-MenY GMT	Anti-PSY GMC µg/ml ELISA
F 1 2.5AH/2.5AH/2.5/2.5	75	3891	17.81
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	92	3968	11.96
F3 5AH/5AH/5/5	79.2	2756	9.51
F4 5AH/5/5/5	80	3914	16.76
Mencevax™	88	3056	21.41

REIVINDICAÇÕES

1. Método de preparar uma composição imunogênica compreendendo conjugar um sacarídeo a um carreador de proteína usando processo químico de condensação de carbodiimida, em que o sacarídeo
5 compreende (por exemplo, como parte de sua unidade de repetição, ou foi derivado de modo a compreender, grupos amino e/ou carboxila, e em que o carreador da proteína compreende, ou foi derivado de modo a compreender, grupos amino e/ou carboxila, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

10 I) se o carreador de proteína compreender tanto grupos amino e carboxila e o sacarídeo compreender ou grupos amino ou carboxila:

a) misturar o sacarídeo e a alíquota de carbodiimida requeridos para executar a conjugação, e

b) adicionar a alíquota de carreador de proteína requerida
15 durante um período de 35 segundos a 6 horas;

II) se o sacarídeo compreender tanto grupos amino e carboxila e o carreador de proteína compreender ou grupos amino ou carboxila:

a) misturar o carreador de proteína e a alíquota de carbodiimida requeridos para executar a conjugação, e

20 b) adicionar a alíquota de sacarídeo requerida durante um período de 35 segundos a 6 horas;

III) se o sacarídeo compreender tanto grupos amino e carboxila e a proteína compreender tanto grupos amino e carboxila:

a) misturar o carreador de proteína e o sacarídeo, e

25 b) adicionar a alíquota de carbodiimida requerida para executar conjugação durante um período de 35 segundos a 6 horas.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que no estágio b) o período é de 50 segundos a 5 horas, de 1 minuto a 4 horas, de 2 minutos a 3 horas, de 3 minutos a 2 horas, de 4 a 60 minutos, de

5 a 50 minutos, de 6 a 40 minutos, de 7 a 30 minutos ou de 8 na 20 minutos.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que no estágio b) o período é de 1 minuto a 5 horas, de 10 minutos a 4 horas, de 20 minutos a 3 horas, de 30 minutos a 2 horas, de 40 a 90 minutos, ou de 50 a 70 minutos.

4. Método de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a carbodiimida é EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ou uma carbodiimida diferente de EDAC.

5. Método de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a alíquota de carbodiimida, requerida para executar a conjugação, é de 0,01 a 3, de 0,05 a 2 ou de 0,09 a 1 mg/m g de sacarídeo.

6. Método de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo e/ou o carreador de proteína foi derivado de modo a compreender grupos amino ou carboxila.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a derivação é efetuada através da adição de um agente de ligação hetero-ou homo-bifuncional.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação possui entre 4 e 12 átomos de carbono.

9. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação possui dois grupos amino reativos.

10. Método de acordo com as reivindicações 7 a 9, caracterizada pelo fato de que o agente de ligação é ADH.

11. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação possui dois grupos de ácido carboxílico reativos.

12. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação possui um grupo amino

reativo em uma extremidade e um grupo de ácido carboxílico reativo na outra extremidade.

13. Método de acordo com as reivindicações 7 a 12, caracterizado pelo fato de que a derivação ocorre através da reação de um grande excesso de agente de ligação com o carreador de proteína e/ou sacarídeo a ser derivado.

14. Método de acordo com as reivindicações 7 a 13, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo compreende um grupo hidroxila reativo como parte de sua unidade de repetição, que é parcialmente derivado através de um grupo amino no agente de ligação.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é parcialmente derivado com processo químico de CDAP.

16. Método de acordo com as reivindicações 7 a 13, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo compreende um grupo amino reativo como parte de sua unidade de repetição, que é parcialmente derivado através de um grupo carboxila no agente de ligação.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é parcialmente derivado com processo químico de condensação de carbodiimida.

18. Método de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 13, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo compreende um grupo carboxila reativo como parte de sua unidade de repetição, que é parcialmente derivado através de um grupo amino no agente de ligação.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é parcialmente derivado com processo químico de carbodiimida.

20. Método de acordo com as reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que no estágio b) a alíquota de carbodiimida,

sacarídeo ou carreador de proteína é adicionada em uma taxa constante, usando uma bomba.

21. Método de acordo com as reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que no estágio b) a alíquota de carbodiimida, 5 sacarídeo ou carreador de proteína é adicionada, em estágios, ao longo do período.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que pelo menos um quarto da alíquota é adicionado ao longo da primeira metade do período, e pelo menos um quarto da alíquota ao longo da 10 segunda metade do período.

23. Método de acordo com a reivindicação 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que a alíquota “a” é adicionada em 4 a 100 estágios “s”.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado 15 pelo fato de que a/s da alíquota são adicionados em cada estágio.

25. Método de acordo com a reivindicação 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que se um estágio ocorrer no momento zero de cada período “p”, cada estágio subsequente ocorre em um período de tempo, que é 20 $p/(s-1)$.

26. Método de acordo com as reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo está presente em uma concentração final de 0,5-50 mg/ml no estágio b).

27. Método de acordo com as reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de que a razão inicial do carreador de proteína para o 25 sacarídeo é de 5:1 a 1:5, de 4:1 a 1:1, ou de 3:1 a 2:1 (p/p).

28. Método de acordo com as reivindicações 1 a 27, caracterizado pelo fato de que a concentração de sal, por exemplo de NaCl, presente no estágio b) é de 0-2, de 0,1-1 ou de 0,2-0,5 M.

29. Método de acordo com as reivindicações 1 a 28,

caracterizado pelo fato de que o carreador de proteína está presente em uma concentração final de 1-50 mg/ml no estágio b).

30. Método de acordo com as reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o pH da reação no estágio b) é mantido em um pH de 4,5-6,5, 4,7-6,0, ou de 5-5,5.

31. Método de acordo com as reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que N-hidroxissuccinimida está também presente na reação no estágio b), e o pH da reação no estágio b) é mantido em um pH de 4,5-7,5.

32. Método de acordo com as reivindicações 1 a 31, caracterizado pelo fato de que a temperatura da reação no estágio b) é mantida em de 4-37, 10-32, 17-30, ou 22-27° C.

33. Método de acordo com as reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que após a alíquota ter sido adicionada no estágio b), a reação é mantida durante um período adicional de 10 minutos a 72 horas, 20 minutos a 48 horas, 30 minutos a 24 horas, 40 minutos a 12 horas, 50 minutos a 6 horas, ou de 1-3 horas.

34. Método de acordo com as reivindicações 1 a 33, caracterizado pelo fato de que uma vez que a reação esteja completada, o pH é ajustado para de 7,5-9.

35. Método de acordo com as reivindicações 1 a 34, caracterizado pelo fato de que compreende um estágio subsequente c), em que o conjugado de sacarídeo-proteína é purificado em uma coluna de cromatografia de exclusão de tamanho.

36. Método de acordo com as reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que compreende um estágio subsequente d), em que o conjugado de sacarídeo proteína é filtrado de modo estéril.

37. Método de acordo com as reivindicações 1 a 36, caracterizado pelo fato de que compreende um estágio subsequente e), em que

uma dose efetiva de conjugado de sacarídeo-proteína é formulado com um excipiente farmacêuticamente aceitável, de modo a manufaturar uma composição imunogênica ou vacina.

38. Método de acordo com a as reivindicações 1 a 37, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é um sacarídeo capsular bacteriano, por exemplo derivado a partir de uma bactéria selecionada a partir de uma lista, que consiste do sorogrupo de *N. meningitidis* A, B, C, W 135 ou Y, sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* 1, 2, 3, 4, 5, 6 A, 6B, 7F, 8, 9 N, 9 V, 10 A, 11 A, 12 F, 14,15 B, 17F, 18 C, 19 A, 19 F, 20, 22 F, 23 F ou 33 F, grupo de *Streptococcus* do Grupo B Ia, Ib, II, III, IV, V, VI ou VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella Typhi* (sacarídeo Vi), *Vibrio cholerae*, ou *H.influenzae* tipo b.

39. Método de acordo com as reivindicações 1 a 38, caracterizado pelo fato de que o peso molecular médio em peso do sacarídeo é de 1000-2000000, 5000-1000000, 10000-500000, 50000-400000, 75000-300000, ou 100000-2000000.

40. Método de acordo com as reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é ou um polissacarídeo nativo ou é dimensionado em um fator de não mais do que 10 x (por exemplo através de microfluidização).

41. Método de acordo com as reivindicações 1 a 37, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo é um lipooligossacarídeo bacteriano ou lipopolissacarídeo, por exemplo derivado a partir de uma bactéria selecionada a partir de uma lista, que consiste de *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *E. coli*, *Salmonella* ou *M. catarrhalis*.

42. Método de acordo com as reivindicações 1 a 41, caracterizado pelo fato de que o carreador de proteína compreende um ou mais epítomos de auxiliar T.

43. Método de acordo com as reivindicações 1 a 42,

caracterizado pelo fato de que o carreador de proteína é selecionado a partir do grupo que consiste de: TT, DT, CRM 197, fragmento C de TT, proteína D de *H. influenzae*, pneumococo PhtD, e pneumococo Pneumolisina.

5 44. Composição imunogênica ou vacina, caracterizada pelo fato de ser obtível através do método como definido nas reivindicações 1 a 43.

45. Uso da composição imunogênica ou vacina como definida na reivindicação 44, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para a prevenção ou o tratamento de doença.

10 46. Método de prevenir ou tratar uma doença, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de administrar uma dose efetiva da composição imunogênica ou vacina de acordo com a reivindicação 44, a um paciente que esteja em necessidade da mesma.

15 47. Uso ou método de acordo com a reivindicação 45 ou 46, caracterizado pelo fato de que a doença é causada através de uma bactéria selecionada a partir de uma lista, que consiste de: *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *Streptococcus* do Grupo B, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhio*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, e *H. influenzae*.

RESUMO

“MÉTODO DE PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA, USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA E MÉTODO DE PREVENIR OU TRATAR
5 UMA DOENÇA”

O presente pedido expõe um método aperfeiçoado para a condução de reações de conjugação de sacarídeo-proteína usando a processo químico de condensação de carbodiimida. Dependendo da natureza do sacarídeo ou do carreador de proteína envolvido, a qualidade do conjugado
10 pode ser aperfeiçoada através da adição de um dos componentes da reação lentamente à mistura da reação. São adicionalmente providas composições imunogênicas, que compreendem conjugados de sacarídeo-proteína produzidos através dos métodos expostos.