

(11) Número de Publicação: **PT 2263688 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 39/95** (2011.01) **A61K 39/385** (2011.01)  
**A61P 31/04** (2011.01) **C12P 19/04** (2011.01)  
**C12R 1/36** (2011.01)

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

(22) Data de pedido: <b>2002.06.20</b>	(73) Titular(es): <b>NOVARTIS AG</b>
(30) Prioridade(s): <b>2001.06.20 GB 0115176</b>	<b>LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL</b> <b>CH</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2010.12.22</b>	(72) Inventor(es): <b>PAOLO COSTANTINO</b> <b>IT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.05.09</b> <b>148/2012</b>	(74) Mandatário: <b>FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE</b> <b>ATAYDE</b> <b>AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **VACINAS COMBINADAS CONTRA NEISSERIA MENINGITIDIS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM KIT QUE COMPREENDE: (A) UM OLIGOSSACÁRIDO CAPSULAR CONJUGADO DO SEROGRUPO A DE N.MENINGITIDIS, NA FORMA LIOFILIZADA; E (B) UM OU MAIS ANTIGÉNIOS NA FORMA LÍQUIDA.

RESUMO

PÍGRAFE:	<b><u>"VACINAS COMBINADAS CONTRA NEISSERIA MENINGITIDIS"</u></b>
----------	--

A invenção refere-se a um kit que compreende: (a) um oligossacárido capsular conjugado do serogrupo A de *N.meningitidis*, na forma liofilizada; e (b) um ou mais antigénios na forma líquida.

## DESCRIÇÃO

<u>EPÍGRAFE:</u>	<b><u>"VACINAS COMBINADAS CONTRA NEISSERIA MENINGITIDIS"</u></b>
------------------	--

### **CAMPO TÉCNICO**

Esta invenção refere-se a vacinas, particularmente a vacinas contra as infecções e doenças meningocócicas.

### **TÉCNICA ANTERIOR**

A *Neisseria meningitidis* é um patogénico humano Gram negativo. Coloniza a faringe, provoca a meningite e, ocasionalmente, a septicémia, na ausência de meningite. Está fortemente relacionada com a *N. gonorrhoeae*, se bem que uma característica que claramente diferencia o meningococo é a presença duma cápsula de polissacárido que está presente em todos os meningococos patogénicos.

Baseado no polissacárido capsular do organismo, têm sido identificados doze serogrupos da *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y e Z). O grupo A é o patogénico mais frequentemente implicado na doença epidémica na África subsariana. Os Serogrupos B e C são responsáveis pela grande maioria dos casos nos E.U.A. e na maioria dos países desenvolvidos. Os serogrupos W135 e Y são responsáveis pelos restantes casos nos E.U.A. e nos países desenvolvidos.

Os polissacáridos capsulares da *N. meningitidis* são tipicamente preparados por um processo que compreende os passos de precipitação de polissacáridos (por exemplo, utilizando detergente catiónico), fraccionamento por etanol, extracção de fenol a frio (para remover as proteínas) e ultracentrifugação (para remover LPS) [por exemplo, ref. 1].

Desde há muitos anos [2,3] que se conhece uma vacina tetravalente de polissacáridos capsulares dos serogrupos A, C, Y e W135, e que foi licenciada para utilização humana. Se bem que eficaz em adolescentes e adultos, induz uma fraca resposta imune e uma reduzida duração de protecção e não pode ser utilizada em crianças [por exemplo, 4]. Isto porque os polissacáridos são antigénios independentes das células T que induzem uma resposta imune fraca que não pode ser reforçada. Os polissacáridos, nesta vacina, não estão conjugados e estão presentes numa proporção de 1:1:1:1 [5]. A MENCEVAX ACWY™ contém 50µg de cada polissacárido purificado uma vez reconstituído da sua forma liofilizada.

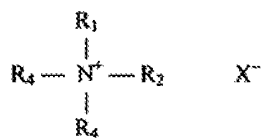
Os oligossacáridos conjugados do serogrupo C também foram aprovados para uso humano [por exemplo, Menjugate™; ref.6]. Mantém-se, no entanto, uma necessidade de aperfeiçoamento nas vacinas conjugadas contra os serogrupos A, W135 e Y, e no seu fabrico.

### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

Nesta invenção é revelado um processo para purificar um polissacárido capsular bacteriano, que compreende os passos de (a) precipitação do referido polissacárido, seguido duma (b) solubilização de polissacárido precipitado utilizando etanol. O polissacárido pode ser usado para preparar vacinas, tais como vacinas conjugadas, em particular contra os serogrupos A, W135 e Y da *N. meningitidis*.

### ***Precipitação e Solubilização com Etanol***

São conhecidas no ramo muitas técnicas para precipitar polissacáridos solúveis. Os métodos preferidos utilizam um ou mais detergentes catiónicos. Os detergentes têm, preferivelmente, a seguinte fórmula geral:



em que:

$R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  são o mesmo ou diferente e cada um significa alquilo ou arilo; ou  $R_1$  e  $R_2$ , juntamente com o átomo de nitrogénio, aos quais estão ligados, formam um anel heterocíclico saturado de 5 ou 6 elementos, e  $R_3$  significa alquilo ou arilo; ou

$R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ , juntamente com o átomo de nitrogénio, aos quais estão ligados, forma um anel heterocíclico de 5 ou 6 elementos, insaturado no átomo de nitrogénio.

$R_4$  significa alquilo ou arilo, e

$X^-$  significa um anião.

Os detergentes particularmente preferidos para uso no método são os sais de tetrabutílamónio e cetiltrimetilamónio (por exemplo, sais de brometo). O brometo de cetiltrimetilamónio ("CTAB") é particularmente preferido [8]. O CTAB é também conhecido como brometo de hexadeciltrimetilamónio, brometo de cetrímónio, Cetavlon e Centimida. Outros detergentes incluem sais de miristiltrimetilamónio e de brometo de hexadimetrina.

São libertados polissacáridos capsulares no meio durante a cultura. Consequentemente, o material inicial para a precipitação será tipicamente o sobrenadante duma cultura bacteriana centrifugada ou será uma cultura concentrada.

O passo de precipitação pode ser selectivo para os polissacáridos, mas também irá tipicamente co-precipitar

outros componentes (por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.).

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

Após a precipitação, o polissacárido (tipicamente sob a forma de um complexo com o detergente catiónico) é re-solubilizado. É preferível usar um solvente que seja relativamente selectivo para o polissacárido a fim de minimizar os contaminantes (por exemplo, proteínas, ácido nucleico, etc.). Descobriu-se que o etanol é vantajoso neste aspecto e é altamente selectivo para o complexo CTAB-polissacárido. Podem ser usados outros álcoois inferiores (por exemplo, metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dióis, etc.)

O etanol é preferivelmente adicionado ao polissacárido precipitado para dar uma concentração final de etanol (baseada no teor total de etanol e água), entre 50% e 95% (por exemplo, cerca de 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, ou cerca de 90%), e, preferivelmente, entre 75% e 95%. A concentração final de etanol óptima pode depender do serogrupo das bactérias, a partir do qual é obtido o polissacárido.

Pode ser adicionado etanol ao polissacárido precipitado, na forma pura, ou pode ser adicionado sob a forma diluída com um solvente miscível (por exemplo, água). As misturas preferidas dos solventes são misturas de etanol:água, numa proporção preferida de cerca de 70:30 a cerca de 95:5 (por exemplo, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

Comparado com os processos convencionais para preparar polissacáridos capsulares, o processo de precipitação de duas fases, seguido pela extracção de etanol, é mais rápido e mais simples.

Em contraste com o processo descrito na ref.9, o processo utiliza o detergente catiónico em vez do detergente aniónico. Ao contrário do processo da ref.10, o polissacárido é re-solubilizado usando etanol, em vez de por troca catiónica usando sais de magnésio ou cálcio. Ao contrário do processo da ref.11, a precipitação não requer um suporte inerte poroso. Além disso, ao contrário dos processos da técnica anterior, o álcool é utilizado para re-solubilizar o polissacárido em vez de o precipitar.

O polissacárido capsular bacteriano será, normalmente, proveniente da *Neisseria*. Preferivelmente, será proveniente da *N. meningitidis*, incluindo os serogrupos A, B, C, W135 e Y. Os serogrupos preferidos são o A, o W135 e o Y.

O processo também será adequado para a preparação de polissacárido capsular de *Haemophilus influenzae* (particularmente do tipo B, ou "Hib"), e do *Streptococcus pneumoniae* (pneumococos).

#### *Processamento Adicional do Polissacárido Solubilizado*

Após a re-solubilização, o polissacárido pode ser ainda tratado para remover os contaminantes. Isto é particularmente importante em situações em que não é aceitável mesmo a contaminação mais baixa (por exemplo, para a produção da vacina humana). Isto envolverá, tipicamente, um ou mais passos de filtração.

Pode ser usada a filtração em profundidade. Isto é particularmente útil para clarificação.

Pode ser usada a filtração através de carvão activado. Isto é útil para remover pigmentos e compostos orgânicos vestigiais. Pode repetir-se até se atingir, por exemplo, uma  $DO_{275nm} < 0,2$ .

Pode ser usada a filtração por tamanho ou a ultrafiltração.

Uma vez filtrado para remover os contaminantes, o polissacárido pode ser precipitado para tratamento e/ou processamento adicional. Isto pode conseguir-se, de forma conveniente, pela troca de catiões (por exemplo, pela adição de sais de cálcio ou de sódio).

O polissacárido pode ser quimicamente modificado. Por exemplo, pode ser modificado para substituir um ou mais grupos hidroxilo por grupos bloqueadores. Isto é particularmente útil para MenA [12]. Os polissacáridos do serogrupo B podem ser N-propionilados [13].

O polissacárido (opcionalmente modificado) será tipicamente hidrolisado para formar oligossacáridos. Isto é preferivelmente realizado para fornecer um grau médio final de polimerização (DP), no oligossacárido, inferior a cerca de 30 (por exemplo, entre 10 e 20, preferivelmente cerca de 10 para o serogrupo A; entre 15 e 25 para os serogrupos W135 e Y, preferivelmente cerca de 15-20, etc.). Os oligossacáridos são preferidos aos polissacáridos, para uso em vacinas. O DP pode ser convenientemente medido por cromatografia de troca iónica ou por ensaios colorimétricos [14].

Se se realizar a hidrólise, o hidrolisado será geralmente dimensionado a fim de remover os oligossacáridos de tamanho reduzido. Isto pode conseguir-se de várias formas, tal como ultrafiltração seguida por cromatografia de troca iónica. Os oligossacáridos com um grau de polimerização inferior ou igual a cerca de 6 são preferivelmente removidos do serogrupo A, e os inferiores a cerca de 4 são preferivelmente removidos dos serogrupos W135 e Y.

Para incrementar a imunogenicidade, os polissacáridos e os oligossacáridos da invenção são preferivelmente conjugados com um transportador (Figura 18). A conjugação com proteínas transportadoras é particularmente útil em vacinas pediátricas



[por exemplo, ref.15], e é uma técnica bem conhecida [por exemplo, revista nas refs.16 a 24, etc.].

As proteínas transportadoras preferidas são toxinas ou toxóides bacterianos, tal como os toxóides de difteria ou tétano. É particularmente preferido o toxóide de difteria CMR<sub>197</sub> [25, 26, 27]. Outras proteínas transportadoras adequadas incluem a proteína da membrana exterior da *N. meningitidis* [28], péptidos sintéticos [29, 30], as proteínas de choque pelo calor [31, 32], as proteínas pertussis [33, 34], as citoquinas [35], as linfoquinas [35], as hormonas [35], os factores de crescimento [35], as proteínas artificiais compreendendo múltiplos epitopos de células T humanos CD4<sup>+</sup>, provenientes de vários antígenos derivados de patógenos [36], de proteína D proveniente da *H. influenza* [37], da toxina A ou B da *C. difficile* [38], etc. É possível usar misturas de proteínas transportadoras.

São preferidos os conjugados com uma proporção sacárido:proteína (m/m) de entre 0,5:1 (i.e. proteína em excesso), e 5:1 (i.e. sacárido em excesso), e aqueles com uma proporção entre 1:1,25 e 1:2,5 são os mais preferidos.

Uma proteína transportadora simples pode transportar múltiplos sacáridos diferentes [39]. Podem ser usados conjugados em conjunto com uma proteína transportadora livre [40].

Pode ser usada qualquer reacção de conjugação adequada, com qualquer ligante adequado, quando necessário.

O sacárido será tipicamente activado ou funcionalizado antes da conjugação. A activação pode envolver, por exemplo, reagentes de cianilação, tais como CDAP (por exemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridínio [41, 42, etc.]). Outras técnicas adequadas utilizam carbodiimidas,

hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzóico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; (ver também a introdução à referência 22).

Podem ser usadas ligações através dum grupo de ligação usando qualquer processo conhecido, por exemplo, os processos descritos nas referências 43 e 44. Outro tipo de ligação envolve a aminação redutora do polissacárido, ligando o grupo amino resultante com uma extremidade de um grupo de ligação de ácido adípico, e, seguidamente, a ligação de uma proteína à outra extremidade do grupo de ligação de ácido adípico [20, 45, 46]. Outros ligantes incluem B-propionamido [47], nitrofenil-etilamino [48], haletos de haloacilo [49], ligações glicosídicas [50], ácido 6-aminocaproico [51], ADH [52], porções C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [53], etc. Como alternativa para utilizar um ligante, pode ser utilizada a ligação directa. As ligações directas à proteína podem compreender a oxidação do polissacárido seguida da aminação redutora com a proteína, como descrito em, por exemplo, as referências 54 e 55.

É preferido um processo que envolve a introdução dos grupos amino no sacárido (por exemplo, pela substituição dos grupos =O terminal, com -NH<sub>2</sub>, seguidos da derivatização com diéster adípico (por exemplo, diéster de ácido adípico N-hidroxisuccinimido) e reacção com a proteína transportadora.

Após a conjugação, os sacáridos livres e conjugados podem ser separados. Existem muitos métodos adequados, incluindo cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração, etc [ver também as refs. 56 e 57].

### ***Misturas e composições que compreendem os Sacáridos***

Os oligossacáridos, polissacáridos e conjugados aqui revelados podem ser misturados com outras moléculas biológicas. São preferidas as misturas de sacáridos a partir

de mais do que um serogrupo de *N. meningitidis*, por exemplo, as composições que compreendem os sacáridos dos serogrupos A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, A+C+W135+Y, etc. É preferível que a eficácia de protecção dos antigénios de sacáridos individuais não seja removida pela sua combinação, caso contrário, a imunogenicidade real (por exemplo, os títulos de ELISA) pode ficar reduzida.

Quando é usado um sacárido do serogrupo C, este tem, preferivelmente, de ~12 a ~22 unidades de repetição.

Os sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* podem ser conjugados com, as mesmas ou diferentes, proteínas transportadoras.

Quando uma mistura compreende sacáridos capsulares dos dois serogrupos A e C, é preferível que a razão (m/m) de sacárido MenA:sacárido MenC seja superior a 1 (por exemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou superior). Surpreendentemente, foi observada uma melhoria da imunogenicidade quando o componente MenA está presente em excesso (massa/dose) em relação ao componente MenC.

Quando uma mistura compreende sacáridos capsulares (por exemplo, oligossacáridos) a partir do serogrupo W135 e pelo menos um dos serogrupos A, C e Y, foi, surpreendentemente, descoberto que a imunogenicidade do sacárido MenW135 é superior quando administrado em combinação com o(s) sacárido(s) de outro(s) serogrupo(s) do que quando administrado sozinho (na mesma dosagem, etc.) [cf. ref. 58]. Assim, a capacidade do antigénio MenW135 para desencadear uma resposta imune é superior à resposta imune desencadeada por uma quantidade equivalente do mesmo antigénio quando distribuído sem associação com os antigénios de outros serogrupos. Esta imunogenicidade aumentada pode ser determinada pela administração do antigénio MenW135 a animais

de controlo e a mistura a animais de teste e comparação dos títulos de anticorpos contra os dois ensaios padrão que se utilizam tais como títulos bactericidas, ensaios de radioimunidade e ELISAs etc. As vacinas que compreendem as combinações sinérgicas de sacáridos do serogrupo W135 e outros serogrupos são, imunologicamente, vantajosas. Estas permitem respostas anti-W135 melhores e/ou doses de W135 menores.

Quando uma mistura compreende sacáridos capsulares do serogrupo Y e de um ou dos dois serogrupos C e W135, é preferível que a razão (m/m) do sacárido MenY:sacárido MenW135 seja superior a 1 (por exemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou superior) e/ou que a razão (m/m) do sacárido MenY:sacárido MenC seja inferior a 1 (por exemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, ou inferior).

As razões preferidas (m/m) para os sacáridos dos serogrupos A:C:W135:Y são: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; e 2:2:2:1.

As misturas também podem compreender proteínas. É preferível incluir as proteínas do serogrupo B da *N. meningitidis* [por exemplo, refs. 59 a 64] ou preparações OMV [por exemplo, refs. 65 a 68 etc.].

Os antigénios não meningocócicos e não *Neisseria*, preferivelmente aqueles que não atenuam a resposta imune contra os componentes meningocócicos, também podem ser incluídos. A Ref. 69, por exemplo, revela combinações de oligossacarídeos dos serogrupos B e C de *N. meningitidis* em conjunto com o sacárido Hib. São preferidos os antigénios de pneumococos, vírus da hepatite A, vírus da hepatite B, *B. pertussis*, difteria, tétano, *Helicobacter pylori*, polio e/ou *H. influenzae*. Os antigénios não *Neisseria* particularmente preferidos incluem:

- antigénios de *Helicobacter pylori* tais como CagA [70 a 73], VacA [74, 75], NAP [76, 77, 78], HopX [por exemplo, 79], HopY [por exemplo, 79] e/ou urease.
- um antigénio sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por exemplo, 80, 81, 82].
- um antigénio do vírus da hepatite A, tal como um vírus inactivado [por exemplo, 83, 84].
- um antigénio do vírus da hepatite B, tal como antigénios da superfície e/ou núcleo [por exemplo, 84, 85], com antigénio da superfície sendo, preferivelmente, adsorvido a um fosfato de alumínio [86].
- um antigénio sacárido de *Haemophilus influenzae B* [por exemplo, 87], preferivelmente não adsorvido ou adsorvido a um fosfato de alumínio [88].
- um antigénio do vírus da hepatite C [por exemplo, 89].
- um antigénio da *N. gonorrhoeae* [por exemplo, 59 a 62].
- um antigénio da *Chlamydia pneumoniae* [por exemplo, refs. 90 a 96].
- um antigénio da *Chlamydia trachomatis* [por exemplo, 97].
- um antigénio da *Porphyromonas gingivalis* [por exemplo, 98].
- antigénios da polio [por exemplo, 99, 100] tais como IPV.
- antigénios da raiva [por exemplo, 101] tais como vírus inactivados liofilizados [por exemplo, 102, RabAvert™].
- antigénios do sarampo, papeira e/ou rubéola [por exemplo, capítulos 9, 10 e 11 da ref. 103].
- antigénios da gripe [por exemplo, capítulo 19 da ref. 103], tais como proteínas da superfície neuraminidase e/ou hemaglutinina.
- um antigénio da *Moraxella catarrhalis* [por exemplo, 104].
- um antigénio de *Streptococcus agalactiae* (streptococcus do grupo B) [por exemplo, 105, 106].
- um antigénio de *Streptococcus pyogenes* (streptococcus do grupo A) [por exemplo, 106, 107, 108].

- um antigénio de *Staphylococcus aureus* [por exemplo, 109].
- antigénios de um paramyxovirus tal como vírus sincicial respiratório (RSV [110, 111]) e/ou vírus parainfluenza (PIV3 [112]).
- um antigénio de *Bacillus anthracis* [por exemplo, 113, 114, 115].
- um antigénio de um vírus da Família *Flaviviridae* (género *Flavivirus*), tal como do vírus da febre amarela, vírus Encefalite Japonesa, quatro serotipos dos vírus do Dengue, vírus da encefalite transmitida por carraças, vírus do Nilo Ocidental (West Nile virus).
- um antigénio de pestivirus, tal como do vírus da febre suína clássica, vírus da diarreia viral bovina, e/ou vírus da Doença de fronteira (vírus da Border Disease).
- um antigénio de parvovirus por exemplo, do parvovirus B 19.
- um toxóide do tétano [por exemplo, ref. 116].
- holotoxina de pertussis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) do *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou aglutinogénios 2 e 3 [por exemplo, refs. 117 e 118].
- antigénio de pertussis celular.

A mistura pode compreender um ou mais destes antigénios, que podem ser destoxificados quando necessário (por exemplo, a destoxificação da toxina de pertussis por meios químicos e/ou genéticos).

Quando é incluído um antigénio da difteria na mistura é preferível também incluir o antigénio do tétano e antigénios de pertussis. Do mesmo modo, quando um antigénio do tétano é incluído é preferível também incluir os antigénios da difteria e pertussis. Do mesmo modo, quando um antigénio de pertussis é incluído é preferível também incluir os antigénios da difteria e tétano.

Os antigénios na mistura estarão, tipicamente, presentes numa concentração de pelo menos 1 µg/ml cada. Geralmente, a concentração de qualquer antigénio adicionado será suficiente para desencadear uma resposta imune contra o referido antigénio.

Como alternativa ao uso de antigénios de proteínas na mistura, podem ser usados os ácidos nucleicos que codificam o antigénio. Os componentes de proteína da mistura podem, assim, ser substituídos por ácidos nucleicos (preferivelmente DNA, por exemplo, na forma de um plasmídeo) que codifica a proteína.

### ***Vacinas de Sacáridos Polivalentes***

Também são reveladas vacinas e composições imunogénicas que compreendem sacáridos capsulares a partir de pelo menos dois (i.e., 2, 3 ou 4) dos serogrupos A, C, W135 e Y da *N. meningitidis*, em que os referidos sacáridos capsulares estão conjugados a proteínas transportadoras e/ou são oligossacarídeos. Quando a vacina tem apenas dois oligossacarídeos ou polissacarídeos conjugados dos serogrupos A, C, W135 e Y, estes não são, preferivelmente, dos serogrupos A e C (cf. refs. 66, 119 e 120). As composições preferidas compreendem sacáridos dos serogrupos C e Y. Outras composições preferidas compreendem sacáridos dos serogrupos C, W135 e Y.

Também é revelada uma composição imunogénica que compreende um conjugado oligossacarídeo do serogrupo A e um conjugado oligossacarídeo do serogrupo C, e ainda que compreende (i) um adjuvante fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio e (ii) um tampão. Quando a composição compreender um adjuvante fosfato de alumínio, o tampão é, preferivelmente, um tampão de fosfato; quando a composição compreender um adjuvante hidróxido de alumínio, o tampão é, preferivelmente, um tampão de histidina.

Quando a vacina compreende um sacárido capsular do serogrupo A, é preferível que o sacárido do serogrupo A seja combinado com os outros sacáridos pouco antes de ser usado, de modo a minimizar a sua hidrólise (cf. sacáridos Hib). Isto pode ser convenientemente conseguido tendo o componente do serogrupo A na forma liofilizada e os outros componentes do serogrupo na forma líquida, com o componente líquido sendo usado para reconstituir o componente liofilizado quando preparado para o uso. O componente líquido compreende, preferivelmente, um adjuvante de sal de alumínio, enquanto o componente liofilizado do serogrupo A pode ou não compreender um adjuvante de sal de alumínio.

É também revelado um kit que compreende: (a) sacárido capsular do serogrupo A de *N. meningitidis*, na forma liofilizada; e (b) sacáridos capsulares de um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3) dos serogrupos C, W135 e Y da *N. meningitidis*, na forma líquida. Os sacáridos estão, preferivelmente, conjugados a proteínas transportadoras e/ou são oligossacarídeos. O kit pode tomar a forma de dois frascos.

É também revelado um método para a preparação de uma composição de vacina, aqui revelada, que compreende a mistura de um sacárido capsular liofilizado a partir do serogrupo A da *N. meningitidis* com sacáridos capsulares a partir de um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3) dos serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, em que um ou mais sacáridos estão na forma líquida.

A invenção fornece um kit que compreende: (a) oligossacarídeo capsular conjugado do serogrupo A de *N. meningitidis*, na forma liofilizada; e (b) um ou mais outros antigénios na forma líquida. O outro antigénio pode ou não ser um oligossacarídeo capsular conjugado do serogrupo C de *N. meningitidis*.



### ***Vacinas e Composições imunogénicas***

Os polissacáridos, os oligossacáridos e os conjugados aqui revelados são particularmente adequados na inclusão de composições imunogénicas e vacinas. Um processo pode então incluir o passo de formulação do polissacárido, oligossacárido ou conjugado como uma composição imunogénica ou vacina. Aqui é revelada uma composição ou uma vacina que é obtida por este meio.

As composições imunogénicas e as vacinas aqui reveladas compreenderão, em adição aos sacáridos meningocócicos, tipicamente, "transportadores farmacologicamente aceitáveis", que incluem qualquer transportador que não induza, por si próprio, a produção de anticorpos prejudiciais para os indivíduos que recebem a composição. Os transportadores adequados são, tipicamente, macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas, tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trealose [121], agregados lipídicos (tais como gotas de óleo ou lipossomas), e partículas de vírus inactivas. Tais transportadores são bem conhecidos para os especialistas no ramo. As vacinas podem também conter diluentes, tais como água, solução salina, glicerol, etc. Adicionalmente, podem estar presentes substâncias adicionais, tais como agentes humidificadores ou emulsionantes, substâncias tampão do pH, e semelhantes. Na ref.122 encontra-se disponível uma discussão extensa de excipientes farmacologicamente aceitáveis.

As composições imunogénicas usadas como vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz do antigénio sacárido, bem como qualquer um dos componentes acima mencionados, conforme necessário. Por "quantidade imunologicamente eficaz", pretende-se dizer que a administração dessa quantidade a um indivíduo, quer numa dose

simples, ou como parte de uma série, é eficaz para tratamento ou prevenção. Esta quantidade varia dependendo da saúde e das condições físicas do indivíduo a ser tratado, idade, grupo taxonómico do indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata, etc.), a capacidade do sistema imunológico do indivíduo para sintetizar anticorpos, o grau de protecção desejado, a formulação da vacina, a determinação do tratamento do médico sobre a situação clínica, e outros factores relevantes. Espera-se que a quantidade se encontre dentro dum âmbito relativamente alargado que pode ser determinado através de ensaios de rotina. A dosagem de tratamento pode ser um esquema de dose única ou um esquema de dose múltipla (por exemplo, incluindo doses de reforço). A vacina pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunorreguladores.

A vacina pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunorreguladores.

A vacina pode incluir um adjuvante. Os adjuvantes preferidos para aumentar a eficácia da composição incluem, mas não se limitam a: (1) sais de alumínio (alum), tais como hidróxidos de alumínio (incluindo oxihidróxidos), fosfatos de alumínio (incluindo hidroxifosfatos), sulfato de alumínio, etc. [Capítulos 8 e 9 na ref. 123]; (2) formulações de emulsão de óleo em água (com ou sem outros agentes imunoestimulantes específicos, tais como péptidos de muramilo [Péptidos de muramilos incluem N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc.] ou componentes da parede celular bacteriana), tal como, por exemplo (a) MF59<sup>TM</sup> [Capítulo 10 na Ref. 123; 124, 125], contendo 5% de Esqualeno, 0,5% de Tween 80, e 0,5% de

Span 85 (contendo, opcionalmente, MTP-PE), formulado em partículas submicrônicas usando um microfluidizador, (b) SAF, contendo 10% de Esqualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero plurônico bloqueado L121, e thr-MDP, quer microfluidizado numa emulsão submicrônica ou em vórtex para gerar uma emulsão de dimensão de partícula maior, e (c) Sistema Adjuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), contendo 2% de Esqualeno, 0,2% de Tween 80, e um ou mais componentes de parede celular bacterianos do grupo consistindo em monofosforilípido A (MLP), dimicolato de trealose (TDM), e esqueleto de parede celular (CWS), preferivelmente MPL + CWS (Detox™); (3) Adjuvantes de saponina [capítulo 22 da ref. 123], tal como QS21 ou Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), quer na forma simples ou na forma de partículas geradas da mesma, tais como ISCOMs (complexos imunoestimulantes; capítulo 23 da ref. 123), ISCOMs essas que podem ser destituídas de detergente adicional, por exemplo, ref. 126; (4) Adjuvante Completo de Freund (CFA), e Adjuvante Incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [127], etc.), interferões (por exemplo, interferão gama), factor de estimulação de colônia de macrófagos (M-CSF), factor de necrose tumoral (TNF), etc.; (6) lípido monofosforil A (MPL) ou MPL 3-O-desacilado (3dMPL) por exemplo, refs. 128 & 129, opcionalmente na ausência substancial de alum quando usado com sacáridos pneumocócicos, por exemplo, ref. 130; (7) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões de óleo-em-água, por exemplo, refs. 131, 132 & 133; (8) oligonucleótidos compreendendo motivos CpG (Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 870-876; Chu *et al.*, *J.Exp.Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*,

*Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu et al., *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224, Krieg et al., *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al., *J. Immunol.* 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al., *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al., *Cell Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al., *Jpn. J. Cancer RES.*, 1988, 79, 866-873; Stacey et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina et al., *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; e Yi et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 5998-5906; Pedidos de Patente Internacionais WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 e WO98/52581) i.e. contendo, pelo menos, um dinucleótido CG, com 5-metilcitosina sendo opcionalmente usada em vez da citosina; (8) um éter de polioxietileno ou um éster de polioxietileno, por exemplo, ref. 134; (9) um surfactante de éster de polioxietileno de sorbitano, em combinação com um octoxinol [135] ou um éter de polioxietileno de alquilo ou um surfactante de éster, em combinação com, pelo menos, um surfactante não iónico adicional, tal como octoxinol [136]; (10) uma saponina e um oligonucleótido imunoestimulador (por exemplo, um oligonucleótido CpG) [137]; (11) um imunoestimulante e uma partícula de sal de metal, por exemplo, ref. 138; (12) uma saponina e uma emulsão de óleo-em-água, por exemplo, ref. 139; (13) uma saponina (por exemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um estero) por exemplo, ref. 140; (14) enterotoxina de *E. coli* lábil ao calor ("LT"), ou mutantes destoxificados do mesmo, tais como o mutante K63 ou o R72 [ por exemplo, Capítulo 5 da ref. 141]; (15) toxina da cólera ("CT"), ou mutantes destoxificados da mesma [por exemplo, Capítulo 5 da ref. 141]; (16) lipossomas [capítulos 13 & 14 da ref. 123]; (17)

quitosano [por exemplo, ref. 142]; (18) RNA de cadeia dupla; (19) micropartículas (*i.e.* uma partícula de ~100 nm a ~150 µm de diâmetro, mais preferivelmente ~200 nm a ~30 µm de diâmetro, e mais preferivelmente ~500 nm a ~10 µm de diâmetro), formadas de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (por exemplo, um poli( $\alpha$ -ácido hidróxido), tal como poli(lactide-co-glicólido), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, *etc.*), opcionalmente tratados para ter uma superfície carregada negativamente (por exemplo, com SDS, ou uma superfície positivamente carregada (por exemplo, com um detergente catiónico, tal como CTAB); ou (20) outras substâncias que actuam como agentes imunoestimulantes para aumentar a eficácia da composição [por exemplo, capítulo 7 da referência 123].

Os sais de alumínio (especialmente fosfatos de alumínio e/ou hidróxidos) e MF59, são preferidos para uso com os antigénios de sacárido aqui revelados. Quando é usado um fosfato de alumínio, é possível adsorver um ou mais dos sacáridos no sal de alumínio, mas é preferível que não adsorva os sacáridos ao sal, e isto é favorecido ao incluir os iões de fosfato livres na solução (por exemplo, pelo uso de um tampão fosfato). Quando é usado o hidróxido de alumínio, é preferível adsorver os sacáridos ao sal. O uso de hidróxido de alumínio, como adjuvante, é particularmente vantajoso para os sacáridos do serogrupo A.

É possível, em composições reveladas nesta invenção, adsorver alguns antigénios ao hidróxido de alumínio, mas possuindo outros antigénios em associação com o fosfato de alumínio. Para as composições tetravalentes do serogrupo da *N. meningitidis*, por exemplo, estão disponíveis as seguintes trocas:

<b>Serogrupo</b>	<b>Sal de Alumínio</b> (H= um hidróxido; P= um fosfato)															
A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Para combinações trivalentes do serogrupo da *N. meningitidis*, estão disponíveis as seguintes permutas:

<b>Serogrupo</b>	<b>Sal de Alumínio</b> (H= um hidróxido; P= um fosfato)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

Uma vez formuladas, as composições podem ser administradas directamente no sujeito. Os sujeitos a ser tratados podem ser animais; em particular, os humanos. As vacinas são particularmente úteis para vacinar crianças e adolescentes. Estas podem ser administradas por via sistémica e/ou através da mucosa.

Tipicamente, as composições imunogénicas são preparadas como injectáveis, quer como soluções líquidas ou suspensões; as formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em, veículos líquidos, antes da injeção, podem ser também preparadas. A preparação pode ser também emulsionada ou encapsulada em lipossomas para um efeito adjuvante aumentado. A libertação directa das composições será geralmente parentérica (por exemplo, por injeção, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular ou libertada para o espaço intersticial dum tecido). As composições podem ser também administradas numa lesão. Outras formas de administração incluem a administração oral e pulmonar,

supositórios, e aplicações transdérmica e transcutânea (por exemplo, ver ref. 143), agulhas, e hiposprays. O tratamento de dosagem pode ser num esquema de dose única ou de dose múltipla (por exemplo, incluindo doses de reforço).

As vacinas aqui reveladas são, preferivelmente, esterilizadas. São, preferivelmente, livres de pirogénios. São preferivelmente tamponizadas, por exemplo, a um pH entre 6 e 8, geralmente perto dum pH de 7. Quando uma vacina compreende um sal de hidróxido de alumínio, é preferível usar um tampão de histidina [144].

As vacinas podem compreender detergentes (por exemplo, um Tween, tal como Tween 80), a níveis reduzidos (por exemplo, <0,01%). As vacinas podem compreender um álcool açucarado (por exemplo, manitol) ou trealose, por exemplo, a cerca de 15 mg/ml, particularmente se forem liofilizados.

Pode determinar-se empiricamente as doses óptimas dos antigénios individuais. Em geral, contudo, os antigénios de sacáridos serão administrados numa dose entre 0,1 a 100 µg de cada sacárido por dose, com um volume de dosagem típica de 0,5 ml. A dose é tipicamente entre 5 e 20 µg por sacárido por dose. Esses valores são medidos como sacáridos.

As vacinas, aqui reveladas, podem ser profiláticas (*i.e.* evitam a infecção), ou terapêuticas (*i.e.*, tratam as doenças após a infecção), mas serão, tipicamente, profiláticas.

A vacina pode ser para uso num método para aumentar a resposta imune num paciente, que compreende a administração da vacina a um paciente. A resposta imune é, preferivelmente, protectora contra a doença meningocócica, e pode compreender uma resposta imune humoral e/ou uma resposta imune celular. O paciente é, preferivelmente, uma criança.

O método pode aumentar uma resposta de reforço, num paciente que já tenha sido vacinado contra *N. meningitidis*.

Também é considerado o uso dum polissacárido, oligossacárido ou conjugado aqui revelado no fabrico de um medicamento para aumentar a resposta imune num animal. O medicamento é, preferivelmente, uma composição imunogénica (por exemplo, uma vacina). O medicamento é, preferivelmente, para a prevenção e/ou tratamento duma doença causada por uma *Neisseria* (por exemplo, meningite, septicemia, gonorreia etc.), por *H. influenzae* (por exemplo, otite média, bronquite, pneumonia, celulite, pericardite, meningite etc.) ou por *Pneumococcus* (por exemplo, meningite, sepsis, pneumonia etc). A prevenção e/ou tratamento da meningite bacteriana é, assim, preferida. As vacinas podem ser testadas em modelos animais padrão (por exemplo, ver ref. 145).

Também é revelado um processo para a solubilização dum polissacárido capsular bacteriano precipitado, em que o etanol é usado como solvente.

### **Definições**

O termo "compreendendo" significa "incluindo" bem assim como "consistindo", por exemplo, uma composição "compreendendo" X pode consistir, exclusivamente, em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

O termo "cerca de", em relação a um valor numérico x significa, por exemplo,  $x \pm 10\%$ .

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1 representa o efeito da variação das proporções de etanol:água na solubilização de polissacáridos.

As Figuras 2 a 4 representam títulos de IgG obtidos em ratinhos contra antigénios de oligossacáridos: a Figura 2 representa os resultados que usam o oligossacárido do serogrupo A; a Figura 3 representa os resultados para o



serogrupo Y; e a Figura 4 representa os resultados para o serogrupo W135.

A Figura 5 representa os títulos de IgG post-II obtidos em ratinhos com uma mistura de conjugados de oligossacáridos para os serogrupos A e C: a Figura 5a representa as respostas anti-serogrupo A; e a Figura 5b representa as respostas anti-serogrupo C.

As Figuras 6 a 8 representam os títulos de IgG obtidos em ratinhos com uma mistura de conjugados oligossacáridos para os serogrupos C, W135 e Y: a Figura 6 representa as respostas anti-serogrupo W135; a Figura 7 representa as respostas anti-serogrupo Y; e a Figura 8 representa as respostas anti-serogrupo C.

As Figuras 9 a 11 representam os títulos de IgG post-II obtidos em ratinhos com uma mistura de conjugados de oligossacáridos para os serogrupos A, C, W135 e Y: a Figura 9 representa as respostas anti-serogrupo W135; a Figura 10 representa as respostas anti-serogrupo Y; e a Figura 11 representa as respostas anti-serogrupo A.

A Figura 12 é a curva de calibração obtida utilizando amostras de teste do polissacárido MenA, a diferentes tempos de hidrólise. A curva representa a relação linear entre a reciprocidade do grau de polimerização e a energia rotativa óptica.

A Figura 13 é a curva de calibração obtida utilizando as amostras de polissacáridos do teste MenY, a diferentes tempos de hidrólise. A curva representa a relação linear entre o logaritmo do grau de polimerização e o CD (Coeficiente de Distribuição).

As Figuras 14 a 16 representam os títulos IgG post-II, divididos pela subclasse IgG, obtidos em ratinhos após a imunização com os conjugados oligossacáridos para os serogrupos: (14) A; (15) C; (16) W135 e (17) Y.

A Figura 17 representa os títulos IgG post-II, divididos pela subclasse IgG, obtidos em ratinhos após a imunização com uma mistura tetravalente dos conjugados oligossacáridos.

A Figura 18 ilustra a preparação de um conjugado oligossacárido.

A Figura 19 representa GMT (A) anti-MenA e (B) anti-MenC (intervalos de confiança  $\pm$  95%) obtidos num modelo de porquinhos-da-índia. Os valores acima das barras são os títulos do ensaio bactericida do soro (SBA) i.e., o recíproco da diluição dos soros em que se obtém 50 % de morte.

## **FORMAS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO**

### **A. Produção e Purificação de Polissacáridos Meningocócicos**

Os meningococos dos serogrupos A, W135 e Y desenvolvem-se em frascos de 500 ml contendo 150 ml de meio de Franz A, durante 12 horas a  $35\pm 1$  °C. Foi estabelecida a agitação a 150 rpm usando um copo misturador de 35mm. 85ml da cultura foram então inoculados num fermentador de 20 L contendo meio de Watson.

18,5 horas depois (W135 e Y) ou 16,5 horas (A), quando se atingiu uma DO de 10, a fermentação foi interrompida adicionando 300 ml de formalina e, em seguida, depois de 2 horas de incubação, o fermentador foi arrefecido a 10 °C. O sobrenadante foi recolhido por centrifugação seguido de filtração (0,22  $\mu$ m), e ultrafiltração com uma membrana de 30 kDa.

O polissacárido concentrado em bruto foi então precipitado por adição de CTAB, como uma solução de 100 mg/ml de água. Os volumes adicionados são representados na tabela seguinte. Após 12 horas à temperatura ambiente, os complexos de CTAB foram recuperados por centrifugação. O complexo CTAB foi extraído

por adição de uma solução de etanol a 95% à temperatura ambiente durante 16-20 horas, sob agitação vigorosa. O volume de etanol adicionado está representado na tabela seguinte:

<b>Serogrupo</b>	<b>Volume CTAB (ml)</b>	<b>Volume de etanol a 95% (litros por kg de pasta húmida)</b>
A	475	3,5 a 6
W135	200	4 a 6
Y	650	3,4

As suspensões resultantes foram filtradas através dum filtro de profundidade CUNO 10 SP. O filtrado foi recirculado através dum cartucho CUNO zetacarbon™ até atingir uma  $DO_{275nm} < 0,2$ . O filtrado de carbono Z foi então recolhido e filtrado através dum filtro de 0,22  $\mu$ m. O polissacárido foi eventualmente precipitado da fase de etanol por adição de uma solução de água  $CaCl_2$  2M (10-12 ml/l da solução final de EtOH). O polissacárido purificado foi então recolhido por centrifugação, lavado com etanol a 95% e seco sob vácuo.

Noutras experiências, a concentração final de etanol usada para extracção foi variada (Figura 1). Para os polissacáridos do serogrupo A, foi mais eficaz o etanol na gama entre 80 e 95%, com uma eficiência de extracção decrescendo em percentagens inferiores. Para o serogrupo W135, foi conseguida uma boa extracção com cerca de 75% e 90% de etanol, com os 95% sendo menos eficazes. Para o serogrupo Y, foram obtidos os melhores resultados com etanol entre 75% e 85%, com percentagens superiores (por exemplo, 90%, 95%) sendo menos eficazes. Em geral, notou-se que as percentagens de etanol abaixo das aqui referidas tendiam a aumentar a co-extracção dos contaminantes tais como proteínas. As percentagens de etanol dadas neste parágrafo são expressas como uma concentração final (etanol como percentagem do volume total de

etanol + água), e são baseadas no conteúdo em água nas pastas polissacárido-CTAB, recuperadas por centrifugação de cerca de 50% (i.e. 500g de H<sub>2</sub>O por quilo de pasta húmida). Este valor foi determinado empiricamente em experiências em escalas reduzidas.

## **B. Conjugação dos Polissacáridos do Serogrupo A**

### a) Hidrólise

O polissacárido meningocócico do Serogrupo A foi hidrolisado em 50 mM de tampão de acetato de sódio, a um pH de 4,7 durante cerca de 3 horas a 73 °C. A hidrólise foi controlada a fim de obter oligossacáridos com um grau médio de polimerização (DP) de, aproximadamente, 10, como determinado pela proporção (m/m) entre o fósforo orgânico total e o fosfato monoéster.

A razão de DP de (fósforo orgânico total) para (monoéster de fósforo) é inversamente proporcional à energia de rotação óptica ( $\alpha$ ), como representado na Figura 12. Esta relação pode ser mais convenientemente utilizada para monitorizar a extensão da hidrólise do que através das medições directas do fósforo.

### b) Dimensionamento

Este passo remove os oligossacáridos de tamanho reduzido gerados durante o processo de hidrólise. O hidrolisado obtido acima foi ultrafiltrado através duma membrana de corte de 30kDa (12 volumes de diafiltração de tampão acetato de 5 mM, pH 6,5). O retido, contendo as espécies mais elevadas de MM, foi rejeitado; o permeado foi carregado numa coluna de Sefarose-Q de Fluxo Rápido, equilibrado num tampão de acetato de 5 mM, a um pH 6,5. A coluna foi então lavada com 5 volumes de coluna (VC) de tampão de equilíbrio, então com 10 VC de

tampão de acetato de 5 mM/125 mM de NaCl a um pH de 6,5, a fim de remover os oligossacáridos com um DP  $\leq 6$ . O oligossacárido dimensionado foi então eluído com 5 VC de tampão acetato de 5mM/NaCl 0,5 M a um pH de 6,5.

A população de oligossacárido eluído tinha um DP de cerca de 15.

c) Introdução dum grupo amino primário no terminal redutor

Foi adicionado sal de amónio (acetato ou cloreto) à solução de oligossacárido dimensionado para uma concentração final entre 49-300 g/L, sendo então o borohidreto de ciano-sódio adicionado a uma concentração final entre 12-73 g/L. Após ajustar o pH entre 6-7,3, a mistura foi incubada a 37 °C durante 5 dias.

Os amino-oligossacáridos foram então purificados por ultrafiltração de fluxo tangencial com uma membrana de corte de 1kDa ou 3kDa, utilizando 13 volumes de diafiltração de NaCl a 0,5 M, seguido por 7 volumes de diafiltração de NaCl a 20 mM. A solução de amino-oligossacárido purificado foi analisada quanto ao conteúdo em fósforo (uma actividade química do antigénio), pelo procedimento da ref. 146, e a quantidade de amino grupos introduzidos pelo procedimento da ref. 147.

Os oligossacáridos purificados foram então secos com um evaporador rotativo para remover a água.

d) Derivatização para Éster Activo

Os amino-oligossacáridos secos foram solubilizados em água destilada a uma concentração de grupo amino de 40 mM, sendo então adicionados 9 volumes de DMSO seguidos de trietil-amino a uma concentração final de 200 mM. À solução resultante, foi adicionado diéster de ácido N-hidroxisuccinimido adípico, para uma concentração final de 480 mM.

A reacção foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, durante 2 horas, sendo então o oligossacárido activado precipitado com acetona (80% v/v da concentração final). O precipitado foi recolhido por centrifugação e lavado várias vezes com acetona para remover diéster de ácido N-hidroxisuccinimido adípico não reactivo e subprodutos. Finalmente o oligossacárido activado foi seco sob vácuo.

Foi determinada a quantidade de grupos de éster activos introduzidos na estrutura de oligossacáridos através dum método colorimétrico, como descrito na ref. 148.

#### e) Conjugação para CRM<sub>197</sub>

O oligossacárido seco activado foi adicionado a uma solução de 45 mg/ml de CRM<sub>197</sub> em 0,01 M de tampão fosfato a um pH de 7,2 para uma proporção éster activo/proteína (mole/mole) de 12:1. A reacção foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, durante a noite. Após este período, o conjugado foi purificado por cromatografia hidrofóbica ou ultrafiltração de fluxo tangencial. O conjugado purificado MenA- CRM<sub>197</sub> foi filtrado esterilizado e armazenado a -20 °C ou -60 °C até à formulação da vacina.

O conjugado foi analisado para: teor em proteínas (Ensaio de proteínas microBCA), teor em sacáridos MenA (Análise Colorimétrica de Fósforo), teor em sacárido livre, perfil de HPLC (em gel TSK G4000SW, 7,5 mm IDx30 cm), e SDS-PAGE. As características das preparações típicas estão representadas na seguinte tabela:

<b>Código do Lote</b>	<b>Sacárido (mg/ml)</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>Glicosilação</b>	<b>KD</b>
210201/A	0,257	0,864	0,3	0,489
210201/BS	0,308	1,354	0,23	0,503

(Continuação)

210201/BL	0,28	1,482	0,19	0,501
351230595	0,138	0,3	0,46	
010900	0,092	0,337	0,27	
DP29	0,105	0,245	0,43	
A1 (NÃO DIMENSIONADO)	0,08	0,291	0,27	
A2 (DIMENSIONADO)	0,446	2,421	0,18	

### **C. Conjugação dos Polissacáridos do Serogrupo W135**

#### a) Hidrólise

O polissacárido meningocócico do grupo W foi hidrolisado em tampão de acetato de sódio acético a 50 mM, pH 4,7, durante cerca de 3 horas a 80 °C. Isto resultou em oligossacáridos com DP médio de cerca de 15 a 20, como determinado pela proporção entre o ácido siálico (SA) e o terminal reduzido de SA.

A proporção do DP de (SA total) para (SA terminal reduzido) está relacionada com o KD, como determinado por HPLC-SEC, como representado na Figura 3. Esta relação pode ser usada para monitorizar a extensão da hidrólise mais convenientemente do que através das medições directas de SA.

#### b) Dimensionamento

O hidrolisado foi ultrafiltrado através duma membrana de corte de 30 KDa (12 a 20 volumes de diafiltração de tampão acetato de 5mM/NaCl 15-30 mM, pH 6,5). O retido, contendo as espécies MM mais altas, foi rejeitado, enquanto o permeado foi carregado numa coluna de Fluxo Rápido de Sefarose-Q, equilibrada num tampão de acetato 5 mM/NaCl 15 mM, pH 6,5. A coluna foi então lavada com tampão de equilíbrio de 10 VC, a

fim de remover os oligossacáridos com DP  $\leq$ 3-4 e eluída com 3 VC de tampão acetato 5 mM/NaCl 500 mM a pH 6,5.

c) Introdução de um grupo amino primário no terminal redutor

O cloreto ou acetato de amónio foi adicionado à solução de oligossacárido dimensionada, a uma concentração final de 300 g/L, sendo então o borohidreto de ciano-sódio- adicionado a 49 g/L ou a uma concentração final de 73 g/L. A mistura foi incubada a 50 °C durante 3 dias.

Os amino-oligossacáridos foram então purificados por ultrafiltração tangencial de fluxo, como descrito para o serogrupo A. O material purificado foi analisado quanto ao seu conteúdo de ácido siálico (método colorimétrico de acordo com a ref. 149 e/ou galactose (HPLC) (Actividades químicas do antigénio MenW135). Os oligossacáridos purificados foram então secos com um evaporador rotativo para remover a água.

d) Derivação para o Éster Activo

Os amino oligossacáridos secos foram derivatizados como descrito acima para o serogrupo A.

e) Conjugação para CRM<sub>197</sub>

A conjugação foi realizada como descrito acima para o serogrupo A mas, para purificar o conjugado, foi utilizada a diafiltração com uma membrana de 30 kDa (50 volumes de diafiltração de tampão fosfato 10 mM, com um pH de 7,2). O conjugado purificado foi esterilizadamente filtrado e armazenado a -20 °C ou -60 °C até se obter uma formulação de vacina.

O conjugado foi analisado quanto aos mesmos parâmetros como descrito acima para o serogrupo A. Foi determinado o



teor em sacárido MenW por determinação colorimétrica de ácido siálico:

<b>Código do Lote</b>	<b>Sacárido (mg/ml)</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>Glicosilação</b>	<b>KD</b>
Lote 1	5,73	3,52	1,63	0,296
Lote 2/4,5	3,51	2,88	1,22	0,308
Lote 3S	2,49	2,25	1,11	0,380
Lote 3Sd	2,03	2,24	0,91	0,394
Lote 3L	2,32	2,3	1,01	0,391
Lote 3Ld	1,94	2,29	0,85	0,383
Lote 3S/pr. Glic6	0,363	0,82	0,44	0,498
Lote 3S/pr. Glic9	0,424	0,739	0,57	0,447
Lote 3S/pr. Glic12	0,479	0,714	0,671	0,414

#### **D. Conjugação dos Polissacáridos do Serogrupo Y**

##### **0102**

##### a) Hidrólise

O polissacárido meningocócico do grupo Y foi hidrolisado como descrito acima para o serogrupo W135. Isto originou oligossacáridos com um DP médio de cerca de 15 a 20, como determinado pela proporção entre o SA e o SA do terminal reduzido (convenientemente medido indirectamente como descrito em C (a) acima).

b) Dimensionamento, c) Introdução do grupo amino, d) Derivatização para ésteres activos, e) Conjugação

Estes passos foram realizados como descrito acima para o serogrupo W135. O conjugado purificado foi filtrado em ambiente estéril e armazenado a -20 °C ou -60 °C, até à formulação da vacina.

O conjugado foi analisado da mesma forma que a descrita acima para o serogrupo W135:

<b>Código do Lote</b>	<b>Sacárido (mg/ml)</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>Glicosilação</b>	<b>KD</b>
Lote 1A	1,16	0,92	1,26	0,303
Lote 1B	4,57	3,55	1,29	0,339
Lote 2/4,5	2,32	6,1	0,38	0,467
Lote 2/6	1,75	5,73	0,3	0,498

#### **E. Imunogenicidade dos conjugados individuais**

O volume congelado de conjugados foi descongelado. Cada um foi diluído, com agitação, para uma concentração final de sacárido 20 µg/ml, fosfato 5 mM, NaCl 9 mg/ml, fosfato de alumínio (para dar uma concentração de Al<sup>3+</sup> de 0,6 mg/ml), pH 7.2. As misturas foram então mantidas, sem agitação, a 2-8 °C durante a noite e outra vez diluídas com solução salina para sacárido 4 µg/ml para a imunização do ratinho.

Um segundo conjunto de vacinas foi preparado para cada serogrupo do mesmo modo, mas a adição do fosfato de alumínio foi substituída com o mesmo volume de água.

Foram injectados s.c. 10 ratinhos Balb/c para cada grupo de imunização duas vezes com 0,5 ml da vacina nas semanas 0 e 4. Foram feitas colheitas de sangue antes da imunização, no dia antes da segunda dose e 2 semanas após a segunda dose. As imunizações foram realizadas com (a) a vacina conjugada com ou sem alum, (b) controlo de solução salina e (c) controlo de polissacárido não conjugado.

Foram determinados os anticorpos específicos IgG anti-polissacárido nos soros dos animais imunizados essencialmente como descrito na ref. 150. O soro de cada ratinho individual foi analisado em duplicado por uma curva de titulação e foi calculada a GMT para cada grupo de imunização. Os títulos

foram calculados em Unidades Elisa de Ratinho (MEU) usando o software 'Titerun' (FDA). Foi determinada a especificidade do título anti-polissacárido por ELISA competitiva com o polissacárido relevante como competidor.

Como representado na Figura 2, o conjugado MenA induziu títulos de anticorpos elevados em animais. Como esperado, o polissacárido não conjugado não era imunogénico. A formulação do conjugado com um fosfato de alumínio como adjuvante induziu um nível elevado de anticorpos quando comparado com o título obtido pelo conjugado sozinho. Do mesmo modo, os resultados foram verificados para o MenY (Figura 3) e MenW135 (Figura 4).

A subclasse IgG das respostas imunes post-II foram medidas para vários grupos. As subclasses específicas foram determinadas usando o mesmo método ELISA como usado para a determinação do título total de IgG na secção E acima, mas usando fosfatase alcalina-anti ratinho -IgG1, -IgG2a, -IgG2b ou -IgG3 (Zymed) como anticorpo secundário. Os títulos foram expressos como OD<sub>405nm</sub> obtidos após 30 minutos de desenvolvimento de substrato usando soro diluído de 1:3200, e estão representados nas Figuras 14 (MenA), 15 (MenW135) e 16 (MenY). As respostas são primariamente na subclasse IgG1, a qual é a subclasse predominantemente induzida nos ratinhos pelos antigénios T-dependentes. Como os polissacáridos são inerentemente antigénios T-independentes que não são capazes de induzir a memória imunológica, estes dados mostram que a conjugação teve o efeito desejado.

Os soros post-II também foram testados quanto à actividade bactericida usando um ensaio *in vitro* para medir a lise da bactéria mediada pelo complemento. Os soros post-II foram inactivados durante 30 minutos a 56 °C antes de serem usados no ensaio, e foi usado 25% de complemento de coelhos bebés como a fonte do complemento. O título bactericida foi expresso como a diluição de soro recíproco com um rendimento de 50% de

morte de bactéria contra as seguintes estirpes: MenA G8238, A1, F6124; MenW135 5554(OAc+) e 242317(OAc-); MenY 242975(OAc) e 240539(OAc+).

Os resultados para MenA incluíram:

<b>Transpor -tador</b>	<b>Sacárido poli/oligo</b>	<b><math>\alpha</math>DP aprox.</b>	<b>Adjuvante alumínio</b>	<b>GMT</b>	<b>Actividade bactericida</b>
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	461	F8238:2048-4096; F6124:2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	920	F8238:4096; F6124: 4096
-	P	-	fosfato	3	F8238:8; F6124:128
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	290	F8238:512-1024
-	P	-	-	2	F8238: <4
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	155	F8238:512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	393	F8238:1024
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	396	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	1396	F8238:4096
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	1461	F8238:2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	1654	F8238:2048
CRM <sub>197</sub>	O	29	fosfato	1053	F8238:2048
CRM <sub>197</sub>	O não dimensionado	10	fosfato	1449	F8238:2048
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	626	F8238:2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	742	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	2207	-
CRM <sub>197</sub>	O	29	-	1363	-
CRM <sub>197</sub>	O não dimensionado	10	-	615	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	1515	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	876	-

(continuação)

Transportador	Sacárido poli/oligo	$\alpha$ DP aprox.	Adjuvante alumínio	GMT	Actividade bactericida
CRM197	O	15	fosfato	1232	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	852	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	863	F8238:2048; A1:2048; F6124: >2048
CRM <sub>197</sub>	O	27	fosfato	1733	F8238:4096-8192; F6124:4096-8192
CRM <sub>197</sub>	O	15	fosfato	172	F8238:1024; A1:1024-2048; F6124:2048
CRM <sub>197</sub>	O	15	hidróxido	619	F8238:1024; A1:2048; F6124:2048

Os resultados para MenW135 incluíram:

Transportador	Sacárido poli/oligo	$\alpha$ DP aprox.	Adjuvante alumínio	GMT	Actividade bactericida
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	14	5554:256-512
CRM <sub>197</sub>	O	+	Fosfato	23	5554:256-512
-	P		-	-	5554:4
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	45	5554:1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	101	5554:64-128
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	80	5554:256-512
CRM <sub>197</sub>	O	+	Fosfato	221	5554:1024-2048; 242317:1024-2048
CRM <sub>197</sub>	O	-	-	52	5554:512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	-	Fosfato	329	5554:1024-2048; 242317:1024-2048
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	41	5554:256-512
CRM <sub>197</sub>	O	+	Fosfato	24	5554:1024; 242317:128-256
CRM <sub>197</sub>	O	-	-	116	5554:256-512

(continuação)

CRM <sub>197</sub>	O	-	Fosfato	185	5554:1024; 242317:512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	Fosfato	565	5554:2048
CRM <sub>197</sub>	O	+	Fosfato	328	5554:512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	Fosfato	490	5554:1024-2048
CRM <sub>197</sub>	O	+	Hidróxido	189	5554:512-1024; 242317:512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	Fosfato	80	5554:512-1024; 242317:512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	Hidróxido	277	5554:512-1024; 242317:1024-2048

Os resultados para MenY incluíram:

<b>Transportador</b>	<b>Sacárido poli/oligo</b>	<b>αDP aprox.</b>	<b>Adjuvante alumínio</b>	<b>GMT</b>	<b>Actividade bactericida</b>
CRM <sub>197</sub>	O	>15	-	751	242975:8192
CRM <sub>197</sub>	O	>15	fosfato	1190	242975:8192-16384; 240539:8192-16384
CRM <sub>197</sub>	O	>15	-	284	242975:2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	>15	fosfato	775	242975:2048-4096
-	P	-	-	-	242975:256
CRM <sub>197</sub>	O	>15	-	1618	242975:4096-8192
CRM <sub>197</sub>	O	>15	-	2123	242975:2048
CRM <sub>197</sub>	O	<10	-	253	242975:512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	<10	-	1060	242975:256-512
CRM <sub>197</sub>	O	>15	hidróxido	1167	242975:8192; 240539:8192-16384
CRM <sub>197</sub>	O	>15	fosfato	665	242975:8192; 240539:8192-16384
CRM <sub>197</sub>	O	>15	fosfato	328	242975:4096; 240539:2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	>15	hidróxido	452	242975:2048; 240539:1024-2048

## **F. A imunogenicidade do conjugado MenA em combinação com o conjugado MenC**

O volume concentrado de CRM-MenC (da Chiron Vaccines, Itália) foi misturado com o volume concentrado de CRM-MenA (obtido como descrito acima) e foram diluídos e misturados com agitação. Foram feitas 3 preparações diferentes. Cada uma contendo sacárido 20 µg/ml para MenA, mas foram incluídas quantidades diferentes do conjugado MenC: (i) sacárido 20 µg/ml (ii) sacárido 10 µg/ml; (iii) sacárido 5 µg/ml. As razões de MenA:MenC (m/m) foram: (i) 1:1; (ii) 2:1; (iii) 4:1.

Cada preparação também continha fosfato de sódio 5 mM, NaCl 9 mg/ml, fosfato de alumínio (para dar uma concentração de Al<sup>3+</sup> de 0,6 mg/ml), pH 7,2. Cada mistura foi então mantida, sem agitação, a 2-8 °C durante a noite e foi feita outra diluição 1:5 com solução salina antes da imunização dos ratinhos.

Um segundo conjunto de vacinas foi preparado do mesmo modo, mas a adição de fosfato de alumínio foi substituída com o mesmo volume de água.

Para cada uma das seis vacinas, foram imunizados 10 ratinhos Balb/c como descrito acima. Os grupos de controlo receberam solução salina ou apenas conjugado MenA.

Os anticorpos anti-polissacáridos para MenA e MenC foram determinados como descrito acima.

Os resultados obtidos com a mistura dos conjugados MenA+MenC indicam claramente que a razão (m/m) entre os componentes A e C joga um papel crucial para a imunogenicidade de MenA.

O título específico anti-MenApS obtido com o controlo do conjugado MenA foi superior (com ou sem adjuvante alum) do que para a combinação MenA+MenC na mesma dosagem (Figura 5a). Quando é usada uma quantidade menor do conjugado MenC na combinação, um melhor título anti-MenApS é induzido pelo

componente do conjugado MenA. Ao mesmo tempo, o título anti-MenC permanece aceitável (Figura 5b).

As experiências também foram realizadas usando um modelo de porquinho-da-índia. Foram feitas três preparações diferentes, usando o mesmo adjuvante de fosfato de alumínio como antes (hidroxifosfato amorfo, PO<sub>4</sub>/Al razão molar entre 0,84 e 0,92, 0,6 mg de Al<sup>3+</sup>/ml):

<b>Preparação</b>	<b>Men A*</b>	<b>MenC *</b>	<b>Razão MenA : MenC</b>
A	20 µg/ml	20 µg/ml	1 : 1
B	40 µg/ml	20 µg/ml	2 : 1
C	20 µg/ml	10 µg/ml	1 : ½
* Expresso como sacárido			

Estas preparações foram diluídas de 1:2 com solução salina e usadas para imunizar os porquinhos-da-índia. Para cada grupo de imunização foram injectados s.c. duas vezes cinco porquinhos-da-índia (estirpe Hartelley, fêmeas, 450-500 gramas) com 0,5 ml da vacina nos dias 0 e 28. Foram feitas recolhas de sangue antes da primeira imunização e depois no dia 42. Os soros foram armazenados a -70 °C antes da análise por ELISA e o ensaio bactericida do soro (contra a estirpe MK 83/94 MenA ou estirpe C11MenC). Os resultados são apresentados na Figura 19.

#### **G. Vacina de combinação para os serogrupos C, W135 e Y**

Os conjugados de polissacáridos a partir dos serogrupos C, W135 e Y foram misturados como descrito acima para dar uma concentração final de sacárido 20 µg/ml para cada conjugado. A vacina continha uma concentração final de fosfato de sódio 5 mM e NaCl a 9 mg/ml, pH 7,2. Após o armazenamento durante a



noite, a mistura foi diluída para conter sacárido 4 µg/ml para cada conjugado para imunização.

As imunizações e análise tiveram lugar como anteriormente.

Os resultados mostram que a imunogenicidade do conjugado MenW135 é aumentada quando é administrado em combinação com os conjugados MenC e MenY, quando comparada com a que é obtida com o conjugado MenW135 sozinho (Figura 6). A imunogenicidade de MenY foi comparável em combinação com a que é obtida com o conjugado individual (Figura 7) e também foi comparável com a imunogenicidade do conjugado MenC (Figura 8).

#### **H. Vacina de combinação para os serogrupos A, C, W135 e Y**

Os conjugados de polissacáridos a partir dos serogrupos C, W135 e Y foram misturados como descrito acima para dar uma concentração final de sacárido 20 µg/ml para os conjugados dos serogrupos A, W135 e Y e sacárido 5 µg/ml para o conjugado do serogrupo C. A vacina continha uma concentração final de fosfato de sódio 5 mM, NaCl 9 mg/ml, fosfato de alumínio (para dar uma concentração de Al<sup>3+</sup> de 0,6 mg/ml), pH 7,2. A mistura foi então mantida, sem agitação, a 2-8 °C durante a noite e diluída novamente com solução salina para dar o sacárido 4 µg/ml para os conjugados A, W135 e Y e o sacárido 1 µg/ml para o conjugado C. Esta mistura diluída foi usada para imunização.

As imunizações e análises tiveram lugar como anteriormente, com os controlos a incluírem os conjugados individuais excepto para o serogrupo C.

A Figura 9 mostra que, tal como anteriormente, a imunogenicidade do conjugado MenW135 foi aumentada quando administrado em combinação com os conjugados MenA, MenC e MenY. A Figura 10 mostra que a imunogenicidade do conjugado MenY não é significativamente diferente quando distribuída em combinação com os conjugados MenA, MenC e MenW135. A Figura 11

mostra que a imunogenicidade do conjugado MenA diminui marcadamente em combinação, mesmo com o conjugado MenC administrado numa dosagem baixa (1/4). Esta competição antigénica não se verifica na vacina polissacárida tetravalente não conjugada (ACWY) [5].

### **I. Antigénio do serogrupo A liofilizado**

O polissacárido capsular do serogrupo A de *N. meningitidis* é particularmente susceptível à hidrólise. Os conjugados do oligossacárido capsular MenA são, por isso, preparados na forma liofilizada, prontos para serem reconstituídos na altura da administração. A forma liofilizada foi preparada para ter componentes que dão a seguinte composição após a reconstituição numa dose unitária:

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
CRM-MenA	Sacárido 20 µg/ml
Tampão de fosfato de potássio	5 mM
Manitol	15 mg/ml

Esta composição não tem adjuvante. Foram preparados dois adjuvantes para a sua reconstituição:

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>	<b>Concentração</b>
Hidróxido de alumínio	0,68 mg Al <sup>3+</sup> /ml	-
Fosfato de alumínio*	-	0,6mg de Al <sup>3+</sup> /ml
Tampão de fosfato de sódio	-	10 Mm
Tampão de Histidina	10 mM	-
Cloreto de sódio	9 mg/ml	9 mg/ml
Tween 80	0,005%	0,005%
pH	7,2±0,05	7,2±0,05
* hidroxifosfato amorfo, razão molar de PO <sub>4</sub> /Al entre 0,84 e 0,92		

Quando foi reconstituído com água para a injeção, a estabilidade do componente sacárido foi como se segue:

Tempo (dias)	Armazenamento a 2-8 °C			Armazenamento a 36-38 °C		
	Sacárido total (µg/ml)	Sacárido livre (µg/ml)	Sacárido livre%	Sacárido total (µg/ml)	Sacárido livre (µg/ml)	Sacárido livre %
0	17,72	1,04	5,9	17,72	1,04	5,9
15	17,01	0,88	5,2	16,52	2,26	13,7
30	17,82	0,89	5,0	17,29	2,64	15,3

Acima da mesma escala de tempo de 4 semanas, o pH estabilizou em 7,2 quer a 2-8 °C quer a 36-38 °C, o conteúdo em proteína estabilizou em cerca de 24,5 µg/ml, e a humidade do conteúdo ficou abaixo de 2,5%.

Quando foi reconstituído com solução de adjuvante de fosfato de alumínio e armazenado a 2-8 °C, a estabilidade foi como se segue:

Tempo (horas)	Sacárido total (µg/ml)	Sacárido livre (µg/ml)	Sacárido livre %
0	16,62	1,09	6,6
24	16,51	0,98	5,9
48	16,83	0,99	5,9

#### **J. Vacina de combinação para serogrupos A, C, W135 e Y (conjugado serogrupo A liofilizado)**

Foi preparada uma mistura trivalente dos componentes MenC, W135 e Y adsorvidos ao adjuvante hidróxido de alumínio (2 mg/ml) ou misturado com um adjuvante de fosfato de alumínio (hidroxifosfato amorfo, razão molar de PO<sub>4</sub>/Al entre 0,84 e 0,92, Al<sup>3+</sup> a 0,6 mg/ml, na presença de tampão fosfato 10 mM). As composições das duas misturas trivalentes foram como se segue:

Componente	Concentração	Concentração
Hidróxido de alumínio	0,68 mg Al <sup>3+</sup> /ml	-
Fosfato de alumínio*	-	0,6mg Al <sup>3+</sup> /ml
CRM-MenC	sacárido 20 µg/ml	sacárido 20 µg/ml
CRM-MenY	sacárido 20 µg/ml	sacárido 20 µg/ml
CRM-MenW135	sacárido 20 µg/ml	sacárido 20 µg/ml
Tampão de fosfato de sódio	-	10 mM
Tampão de Histidina	10 mM	-
Cloreto de sódio	9 mg/ml	9 mg/ml
Tween 80	0,005%	0,005%
*hidroxifosfato amorfo, razão molar de PO <sub>4</sub> /Al entre 0,84 e 0,92		

Para a mistura de hidróxido, a estabilidade dos componentes sacáridos foi como se segue:

Tempo (dias)	Armazenado a 2-8°C		Armazenado a 36-38°C	
	Sacárido livre (µg/ml)	Sacárido livre %	Sacárido livre (µg/ml)	Sacárido livre %
Volume de MenC				
0	<1,2	<6	<1,2	<6
15	<1,2	<6	<1,2	<6
30	<1,2	<6	<1,2	<6
Frascos de MenC				
0	<1,2	<6	<1,2	<6
15	<1,2	<6	<1,2	<6
30	<1,2	<6	1,3	6,6
Volume de MenW135				
0	2,5	12,5	2,5	12,5
15	2,3	11,4	3,4	16,8
30	2,3	11,5	3,5	17,3
Frascos de MenW135				
0	2,1	10,6	2,1	10,6
15	2,3	11,7	2,7	13,3
30	20,	10,2	3,3	16,3

(continuação)

Volume de MenY				
0	1,7	8,3	1,7	8,3
15	<1,3	<6,3	2,0	10,2
30	1,3	6,3	2,4	12,2
Frascos de MenY				
0	1,4	7,1	1,4	7,1
15	1,5	7,6	2,1	10,7
30	1,3	6,3	2,9	14,3

Sobre a mesma escala de tempo de 4 semanas, o pH estabilizou a  $7,15 \pm 0,05$  quer a 2-8 °C quer a 36-38 °C.

Para a mistura de fosfato, a estabilidade dos componentes sacáridos foi como se segue:

Tempo (dias)	Armazenado a 2-8°C			Armazenado a 36-38°C		
	Sacárido total (µg/ml)	Sacárido livre (µg/ml)	Sacárido livre %	Sacárido total (µg/ml)	Sacárido livre (µg/ml)	Sacárido livre %
Volume de MenC						
0	22,8	<1,0	<5	22,8	<1,0	<5
15	17,2	<1,0	<5	18,6	<1,0	<5
30	18,9	<1,0	<5	20,5	<1,0	<5
Frascos de MenC						
0	20,5	<1,0	<5	20,5	<1,0	<5
15	18,3	<1,0	<5	23,4	<1,0	<5
30	18,0	<1,0	<5	20,5	<1,0	<5
Volume de MenW135						
0	20,7	2,0	10,4	20,7	2,0	10,4
15	21,9	2,3	11,6	21,2	2,1	10,3
30	19,6	2,1	10,6	21,0	2,4	11,8
Frascos de MenW135						
0	23,4	1,7	8,4	23,4	1,7	8,4
15	21,2	1,9	9,5	20,1	2,2	11,1
30	20,1	2,2	11,2	21,3	3,2	16,1

(continuação)

Volume de MenY						
0	19,1	<1,1	<5,3	19,1	<1,1	<5,3
15	20,1	1,4	6,8	18,7	1,3	6,4
30	18,6	1,4	7,6	19,2	1,7	8,3
Frascos de MenY						
0	21,4	<1,1	<5,3	21,4	<1,1	<5,3
15	19,6	1,4	6,8	19,0	1,5	7,4
30	17,7	1,2	6,2	18,4	1,9	9,4

Sobre a mesma escala de tempo de 4 semanas, o pH estabilizou a  $7,05 \pm 0,05$  quer a  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  quer a  $36-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As composições líquidas trivalentes foram diluídas e usou-se 0,5 ml para reconstituir o conjugado MenA liofilizado. A mistura tetraivalente resultante foi administrada a 10 ratinhos Balb/c (fêmeas com 6-8 semanas de idade), por grupo, através de injeção subcutânea no dia 0 e 28. A mistura continha 2  $\mu\text{g}$  de cada conjugado sacárido por dose, o que representa 1/5 de uma dose humana única (SHD). Os controlos foram uma solução salina ou polissacáridos homólogos não conjugados. Foram feitas recolhas de sangue antes da imunização e depois no dia 42, com os soros armazenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O IgG foi determinado como descrito acima.

Todos os conjugados usados foram seguros e imunogénicos nos animais. Os títulos de GMT post-II por ELISA (com 95% de intervalo de confiança) foram como se segue:

Vacina	Adjuvante	A	Y	W135	C
MenA (liofilizado e ressuspendido)	Fosfato de alumínio	172 (69-439)	-	-	-
	Hidróxido de alumínio	619 (419-906)	-	-	-

(continuação)

<b>Vacina</b>	<b>Adjuvante</b>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>W135</b>	<b>C</b>
MenY	Fosfato de alumínio	-	328 (147-731)	-	-
	Hidróxido de alumínio	-	452 (344-593)	-	-
MenW	Fosfato de alumínio	-	-	80 (28-225)	-
	Hidróxido de alumínio	-	-	277 (185-411)	-
MenC	Fosfato de alumínio	-	-	-	317 (152-659)
	Hidróxido de alumínio	-	-	-	723 (615-851)
MenA (liofilizado) + MenC, W135, Y	Fosfato de alumínio	32 (15-68)	397 (252-627)	99 (35-288)	114 (53-246)
	Hidróxido de alumínio	206 (112-372)	141 (97-205)	139 (76-251)	163 (122-218)

A Figura 17 apresenta a análise dos resultados da subclasse IgG para: (17A) MenA; (17B) MenC; (17C) MenW135; e (17D) MenY. A IgG1 é claramente a subclasse mais proeminente.

Os títulos bactericidas do soro foram como se segue:

Vacina	Adjuvante	Anti-MenA		Anti-MenY		Anti-MenW135	Anti-MenC					
		F8238	AI	F5124	AI			242975	240539	5554	242317	
MenA (Inoflizado)	Fosfato de Aluminio	512-1024	1024-2048	2048	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hidróxido de Aluminio	1024-2048	1024-2048	2048	-	-	-	-	-	-	-	-
MenY	Fosfato de Aluminio	-	-	-	4096	2048-4096	-	-	-	-	-	-
	Hidróxido de aluminio	-	-	-	2048	1024-2048	-	-	-	-	-	-
MenW	Fosfato de aluminio	-	-	-	-	-	-	512	512-1024	-	-	-
	Hidróxido de aluminio	-	-	-	-	-	-	1024	1024-2048	-	-	-
MenC	Fosfato de aluminio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2048-4096	-
	Hidróxido de aluminio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4096
MenA (Inoflizado)+ MenC, W135, Y	Fosfato de aluminio	128-256	1024	1024-2048	2048	-	-	256-512	1024	-	-	512
	Hidróxido de aluminio	512	1024-2048	1024-2048	2048-4096	-	-	256-512	1024	-	-	510-1024



**K. Vacina de combinação para os serogrupos A, C, W135 e Y (dosagens diferentes)**

Os ratinhos foram imunizados como descrito acima, mas as composições da vacina continham razões diferentes de vários conjugados de oligossacáridos. As doses variaram de 0,5, 1, 2 ou 4 µg/dose. O oligo-conjugado MenA liofilizado foi usado em todas as experiências.

Os títulos ELISA foram como se segue:

Quantidade de antigénio (µg/dose)				Adjuvant e alumínio	GMT ELISA (intervalo de confiança de 95%)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	Fosfato	177 (107-291)	367 (263-510)	239 (135-424)	239 (184-311)
4	2	2	2	Hidróxido	390 (313-486)	494 (345-706)	338 (266-430)	158 (96-260)
2	2	2	2	Fosfato	132 (59-296)	582 (268-1155)	143 (75-272)	247 (152-400)
2	2	2	2	Hidróxido	337 (239-476)	569 (462-679)	171 (117-251)	100 (59-169)
4	2	1	1	Fosfato	137 (47-397)	192 (88-421)	18 (4-75)	315 (174-571)
4	2	1	0.5	Fosfato	152 (85-271)	207 (100-428)	51 (21-125)	220 (125-388)
4	2	1	2	Fosfato	113 (49-263)	230 (98-540)	23 (6-91)	267 (81-877)
4	2	0.5	1	Fosfato	267 (109-656)	504 (300-847)	46 (15-134)	583 (330-1030)
4	2	2	1	Fosfato	87 (49-155)	118 (51-278)	24 (8-72)	214 (140-326)
2	2	1	1	Fosfato	217 (132-355)	514 (332-796)	110 (66-183)	206 (141-300)
2	2	1	0.5	Fosfato	105 (40-279)	381 (180-808)	90 (34-236)	206 (96-445)

(Continuação)

2	2	1	2	Fosfato	155 (71-339)	374 (196-713)	53 (28-100)	502 (335-752)
2	2	0.5	1	Fosfato	224 (125-400)	358 (223-577)	43 (14-128)	624 (426-914)
2	2	2	1	Fosfato	180 (113-288)	306 (190-492)	70 (34-146)	423 (258-696)

Os títulos bactericidas do soro foram como se segue:

Quantidade de antigénio ( $\mu\text{g}/\text{dose}$ )				Adjuvante alumínio	Título de anticorpo bactericida			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	Fosfato	256-512	1024-2048	1024-2048	4096-8192
4	2	2	2	Hidróxido	1024-2048	256-512	1024-2048	1024-2048
2	2	2	2	Fosfato	512-1024	1024-2048	128-256	8192-16384
2	2	2	2	Hidróxido	256	1024-2048	256	512-1024
4	2	1	1	Fosfato	512-1024	2048	128	2048-4096
4	2	1	0.5	Fosfato	512-1024	1024-2048	128	2048-4096
4	2	1	2	Fosfato	512-1024	2048-4096	128	8192-16384
4	2	0.5	1	Fosfato	1024-2048	8192	256-512	8192-16384
4	2	2	1	Fosfato	-	2048-4096	128	4096-8192
2	2	1	1	Fosfato	1024-2048	1024-2048	256	4096-8192
2	2	1	0.5	Fosfato	1024-2048	2048-4096	256-512	2048-4096
2	2	1	2	Fosfato	512-1024	1024-2048	128	8192-16384
2	2	0.5	1	Fosfato	1024-2048	2048	256-512	4096-8192
2	2	2	1	Fosfato	128-256	512-1024	64-128	1024-2048

Foi realizado um segundo conjunto de experiência usando uma dosagem de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de sacárido para MenA e MenC, metade dessa dosagem para MenY, e um quarto da dosagem para MenW135. Os títulos ELISA foram como se segue:

Quantidade de antigénio ( $\mu\text{g}/\text{dose}$ )				Adjuvante alumínio	GMT ELISA (intervalo de confiança de 95%)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
2	2	2	2	Fosfato	32 (15-68)	114 (53-246)	99 (35-288)	397 (252-627)
				Hidróxido	206 (112-372)	163 (122-218)	139 (76-251)	141 (97-205)
2	2	1	0.5	Fosfato	96 (49-187)	238 (101-561)	42 (20-89)	315 (114-867)
				Hidróxido	293 (144-597)	267 (158-451)	83 (43-163)	244 (152-392)

Os títulos bactericidas do soro foram como se segue:

Quantidade de antigénio ( $\mu\text{g}/\text{dose}$ )				Adjuvante alumínio	A		C	W135		Y	
A	C	W	Y		FB238	A1	F5124	C11	5554	242317	242975
2	2	2	2	Fosfato	128-256	1024	1024-2048	512	256-512	1024	2048
				Hidróxido	512	1024-2048	1024-2048	512-1024	256-512	1024	2048-4096
2	2	1	0.5	Fosfato	256	-	1024-2048	512	256-512	1024	2048-4096
				Hidróxido	128	-	512-1024	512-1024	512-1024	1024	1024

#### L. Conjugados de Oligossacáridos de MenA, W135 e Y

A tabela que se segue representa dados relativos aos conjugados MenA, MenW135 e MenY, adequados para fabricar composições da combinação, aqui reveladas:

	A	W135	Y
DP após dimensionamento	16,6	21,9	21,1
Proporção Sacárido/Proteína	0,5	1,1	0,7
KD	0,44	0,36	0,41
Sacárido Livre	5%	10%	5%
Proteína Livre	<2%	<2%	<2%

Deve ser compreendido que a invenção foi descrita apenas como exemplo e que podem ser efectuadas modificações enquanto

abrangidas pelo âmbito da invenção, que é definida pelas reivindicações anexas.

Lisboa, 26 de Julho de 2012

## REIVINDICAÇÕES

1. Um kit caracterizado por compreender: (a) um oligossacárido capsular conjugado a partir do serogrupo A de *N. meningitidis*, na forma liofilizada; e (b) um ou mais antigénios adicionais, na forma líquida.

2. O kit, de acordo com a Reivindicação N.º.1, caracterizado pelo oligossacárido capsular do serogrupo A da *N. meningitidis* ser conjugado a uma toxina ou toxóide bacteriano.

3. O kit, de acordo com a Reivindicação N.º.2, caracterizado por a toxina ou toxóide bacteriano ser o toxóide de difteria, toxóide de tétano ou o toxóide de difteria CRM197.

4. O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por a conjugação ser através dum processo que envolve a introdução de grupos amino no sacárido seguindo-se a derivatização com um diéster adípico e a reacção com a proteína transportadora.

5. O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por o oligossacárido capsular conjugado do serogrupo A de *N. meningitidis* ter uma razão sacárido:proteína (m/m) entre 0,5:1 e 5:1.

6. O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por o oligossacárido capsular conjugado do serogrupo A de *N. meningitidis* ser adsorvido a um adjuvante de hidróxido de alumínio.

7. O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por o componente (b) compreender um adjuvante de sal de alumínio.

8. O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por o sacárido do serogrupo A ter um grau médio de polimerização entre 10 e 20.

**9.** O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por o componente (b) compreender um antigénio sacárido de *Haemophilus influenzae* B.

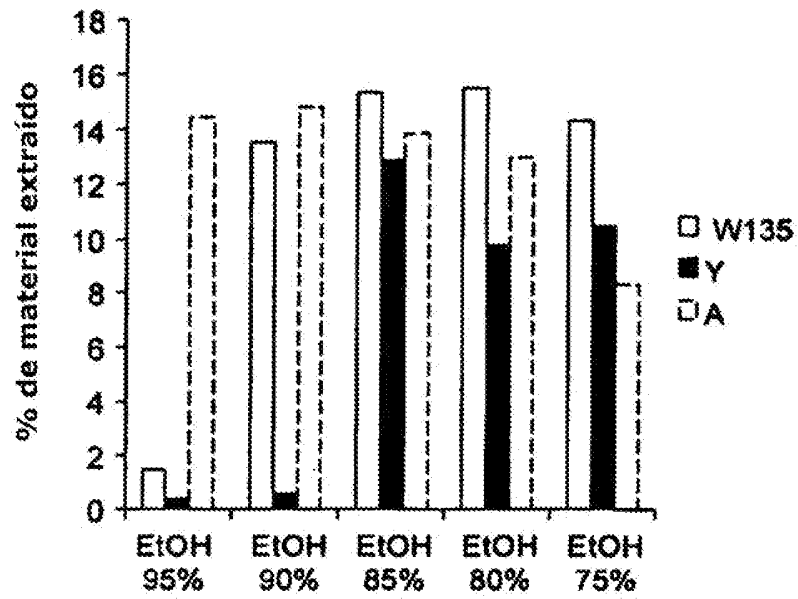
**10.** O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por estar na forma de dois frascos.

**11.** O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por a dose ser entre 5 e 20 µg por sacárido por dose.

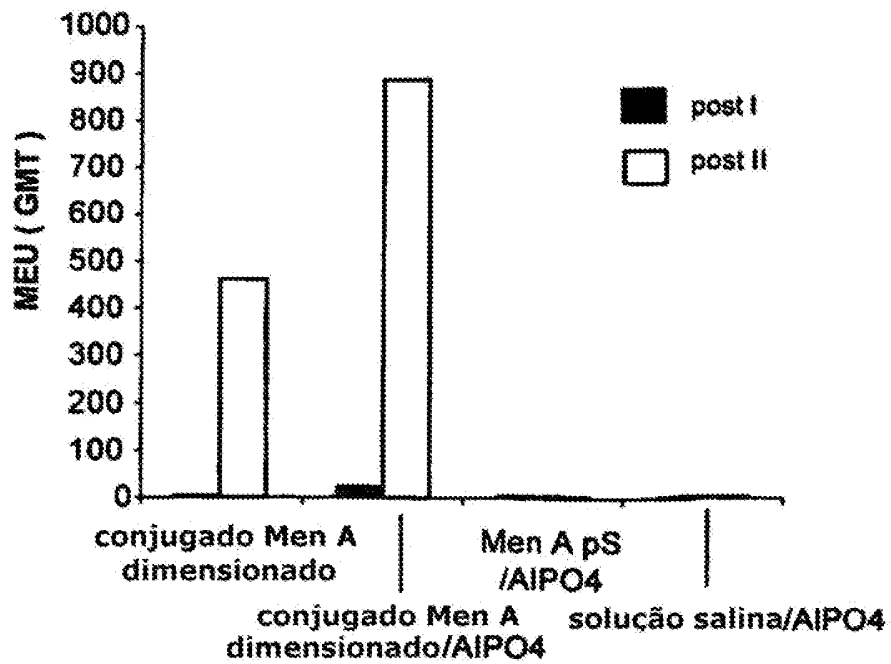
**12.** O kit, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, caracterizado por o antigénio adicional no componente (b) ser um oligossacárido capsular conjugado do serogrupo C de *N. meningitidis*.

Lisboa, 26 de Julho de 2012

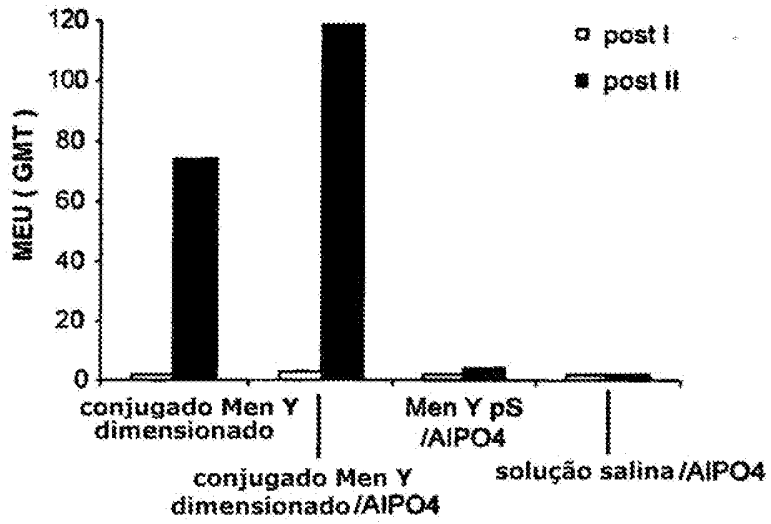
**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**

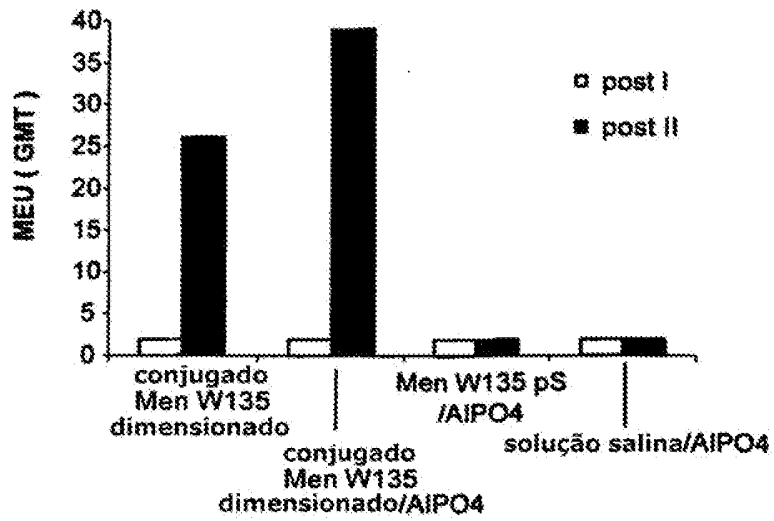
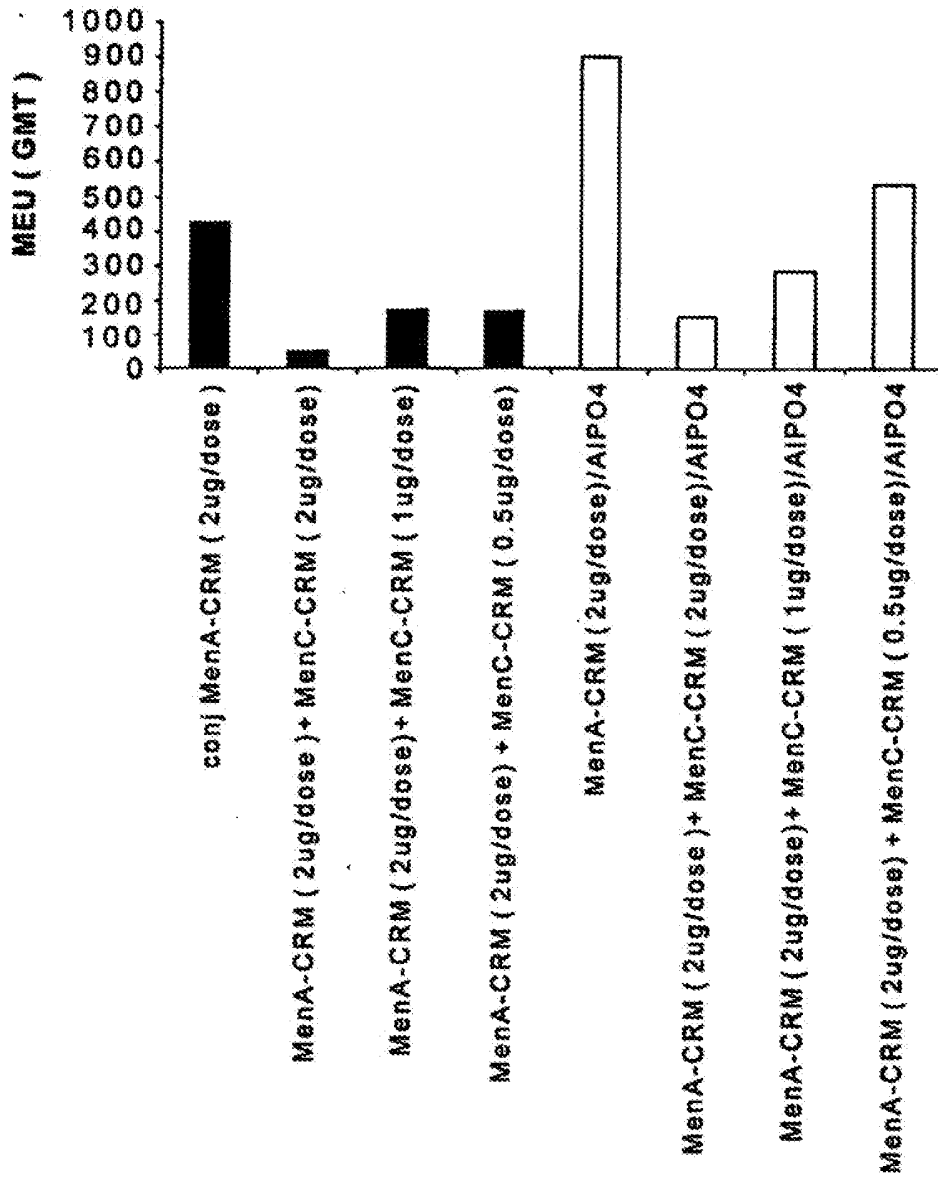
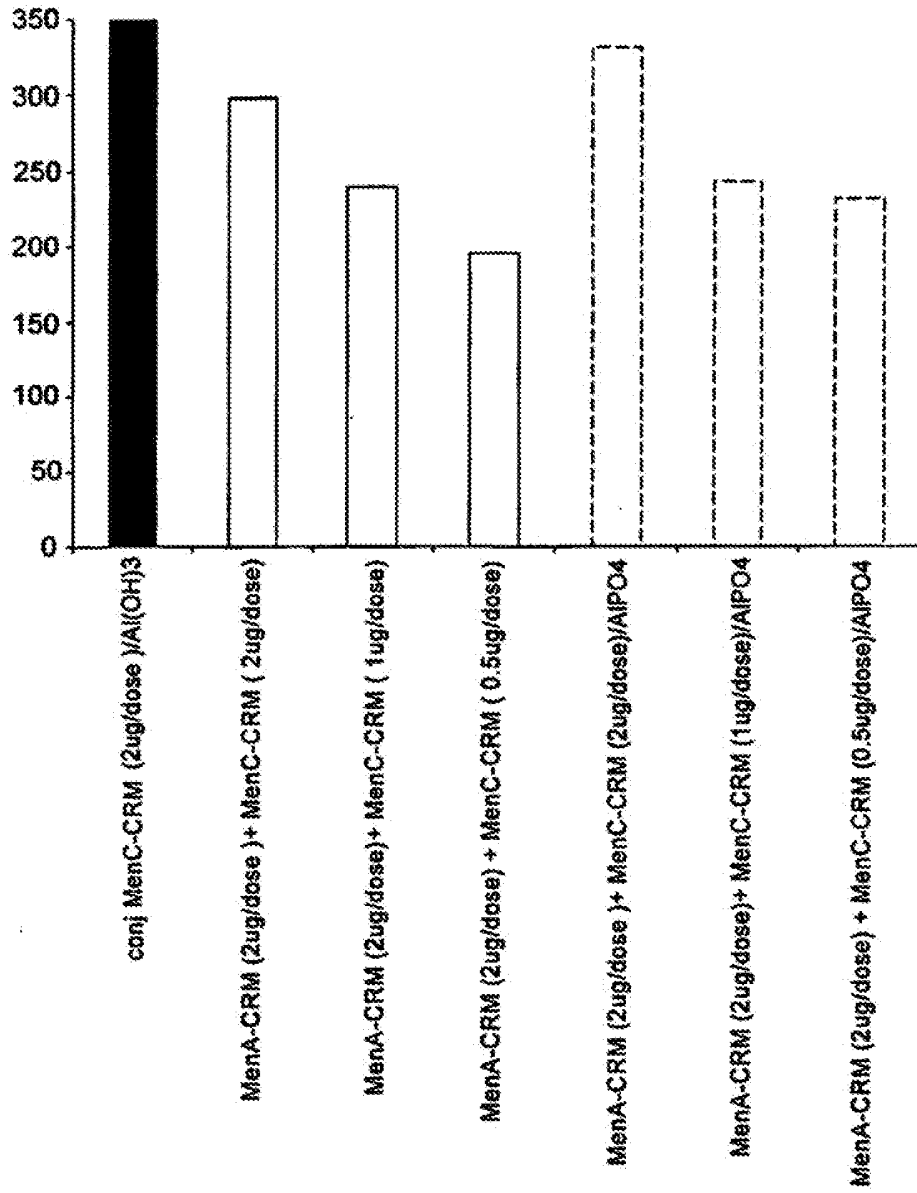


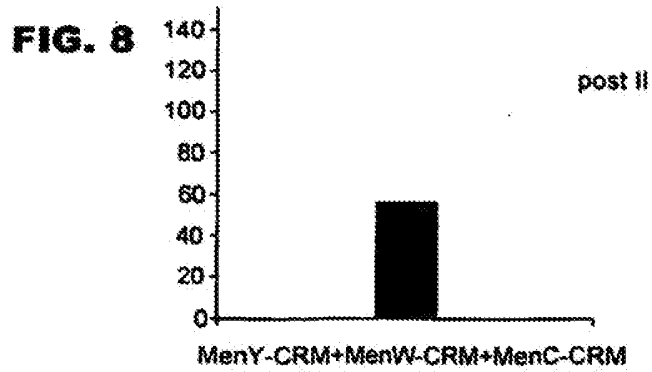
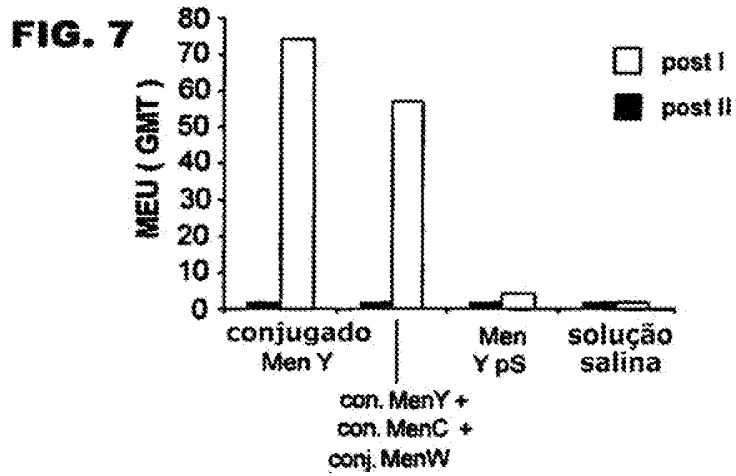
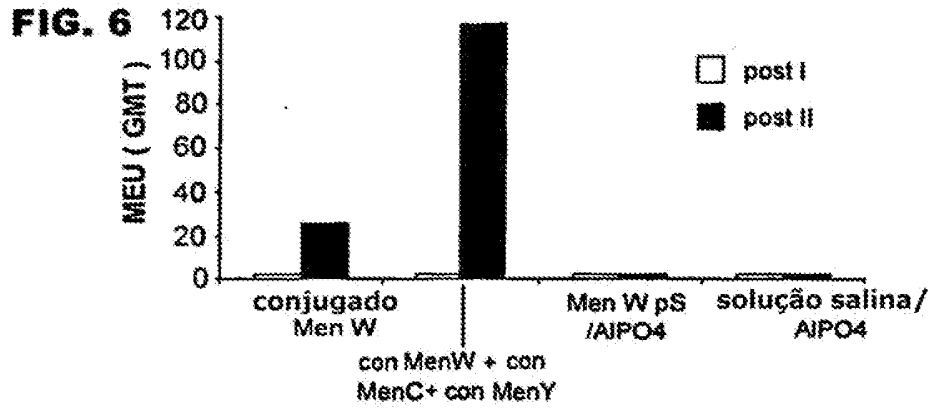


FIG. 5a

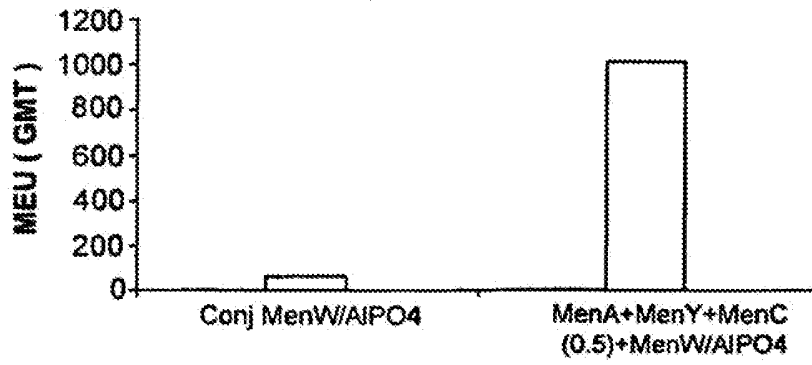


**FIG. 5b**

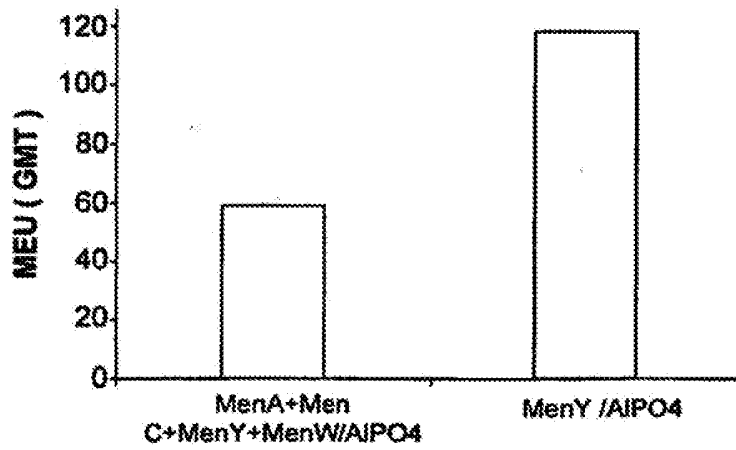




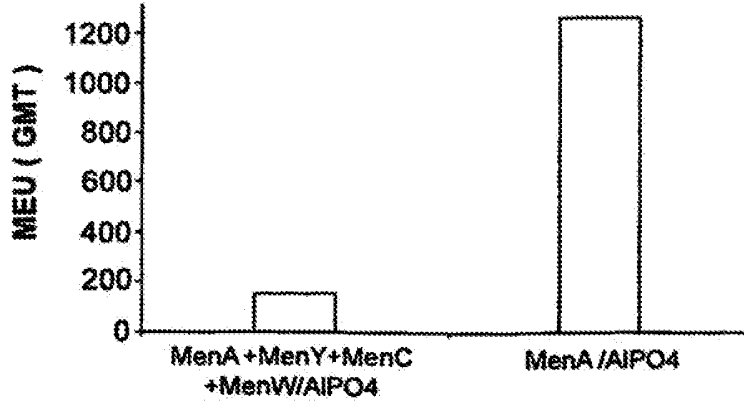
**FIG. 9**



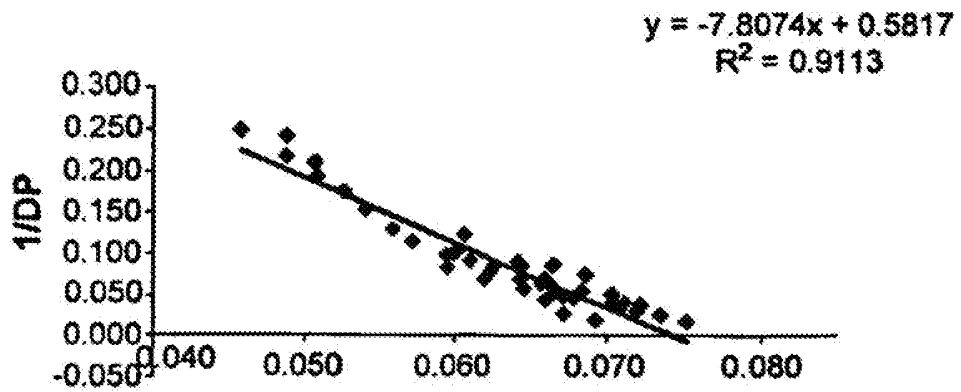
**FIG. 10**



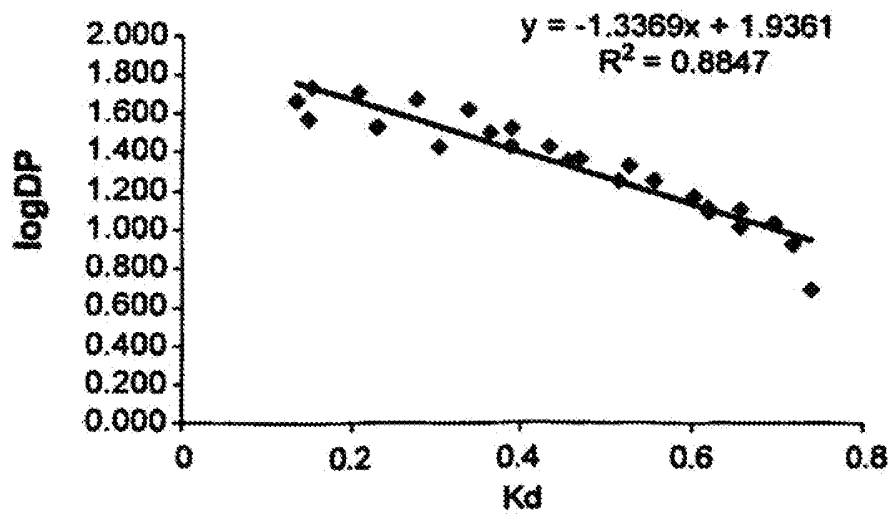
**FIG. 11**



**FIG. 12**



**FIG. 13**



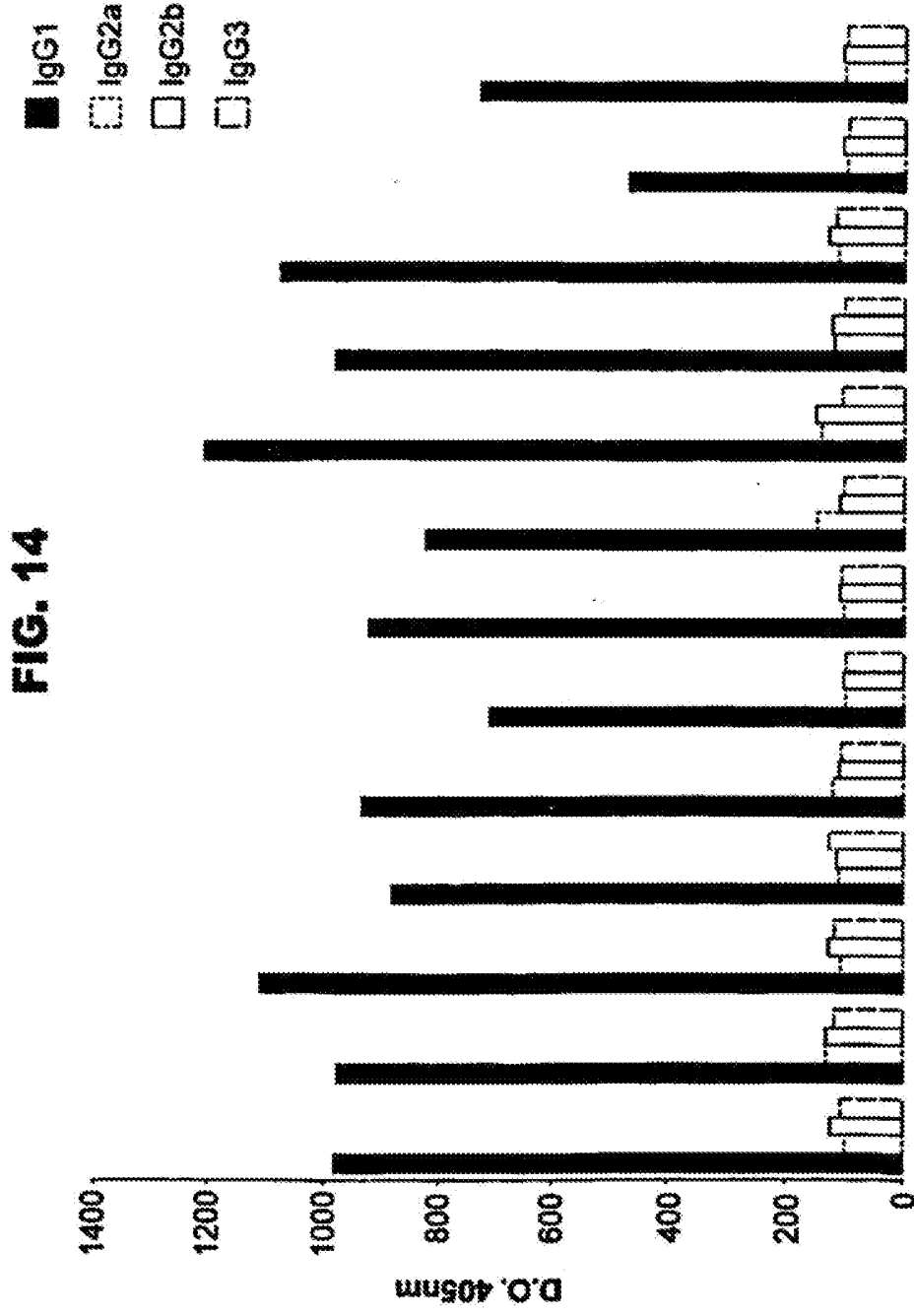
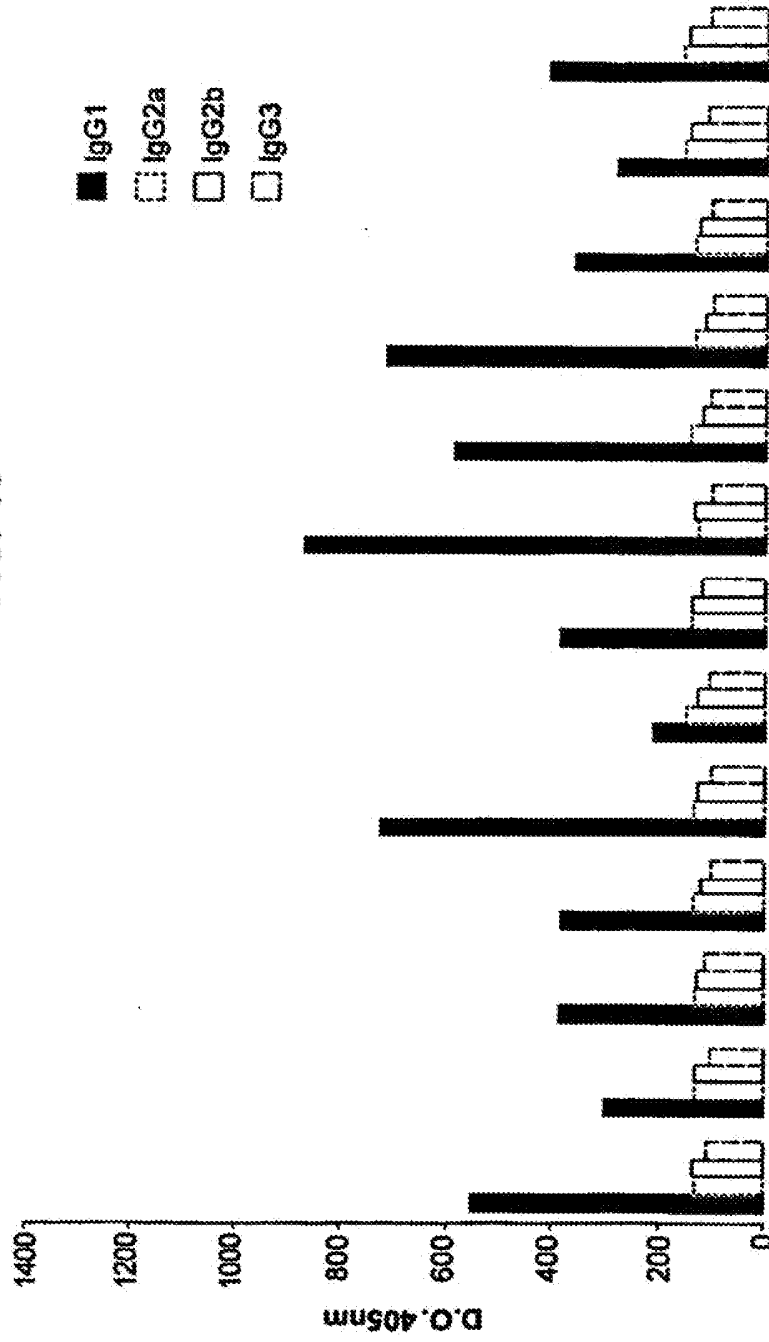


FIG. 15



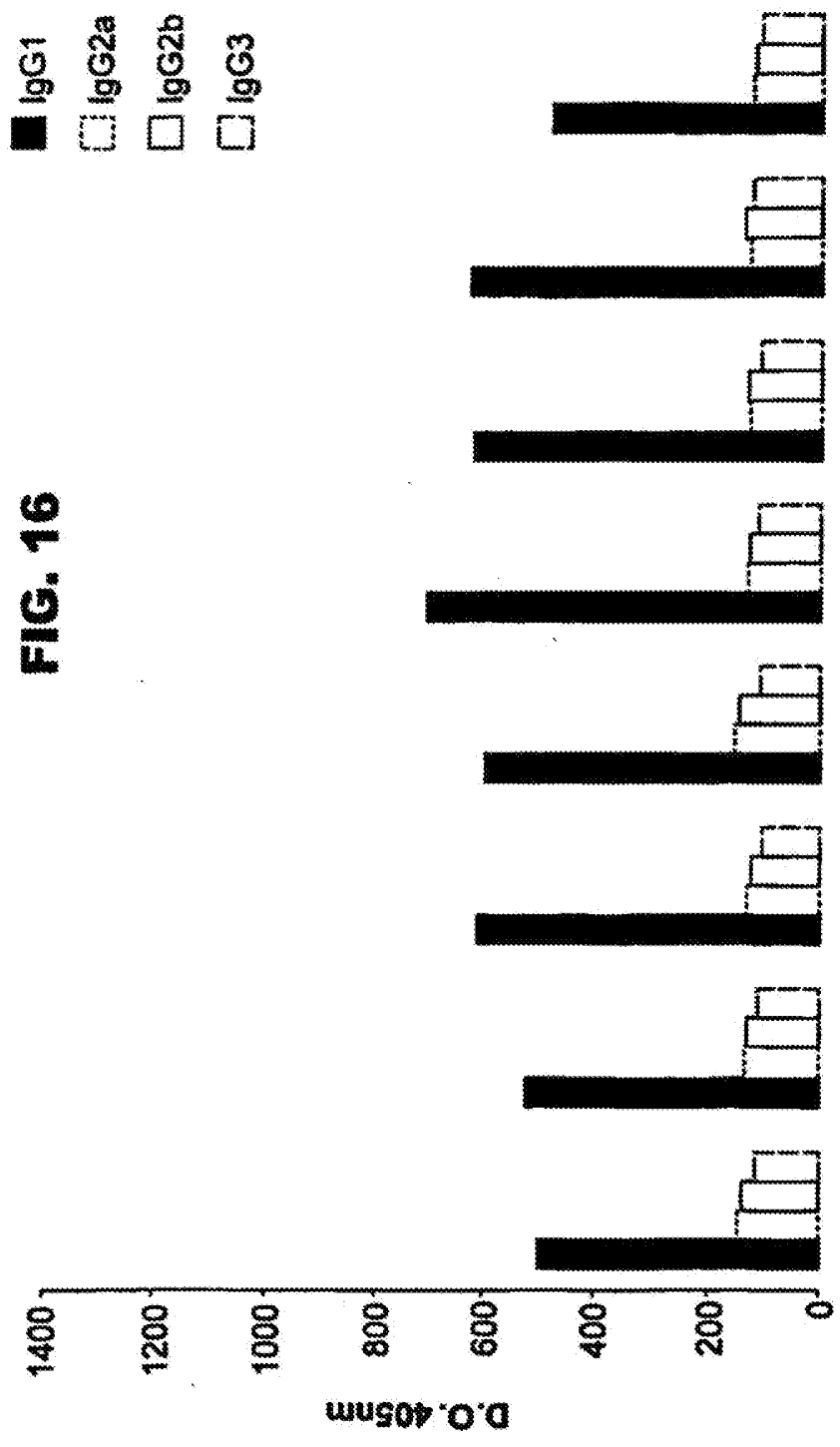
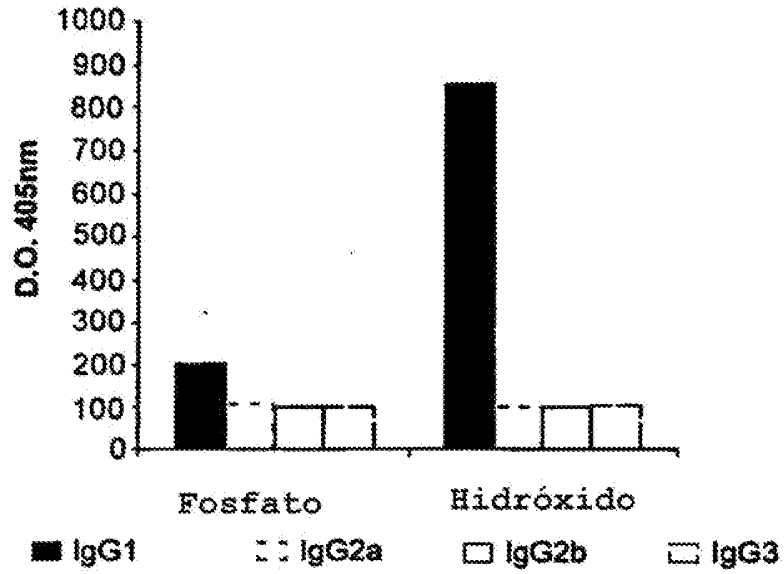


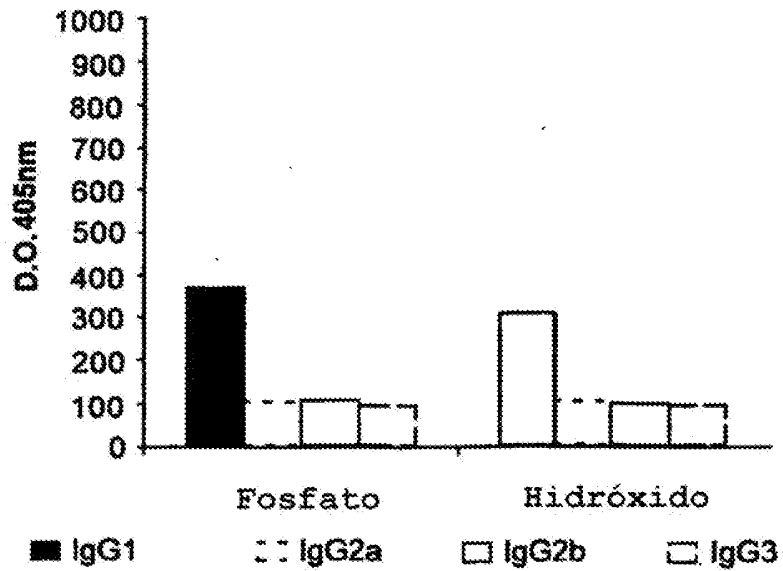
FIG. 16

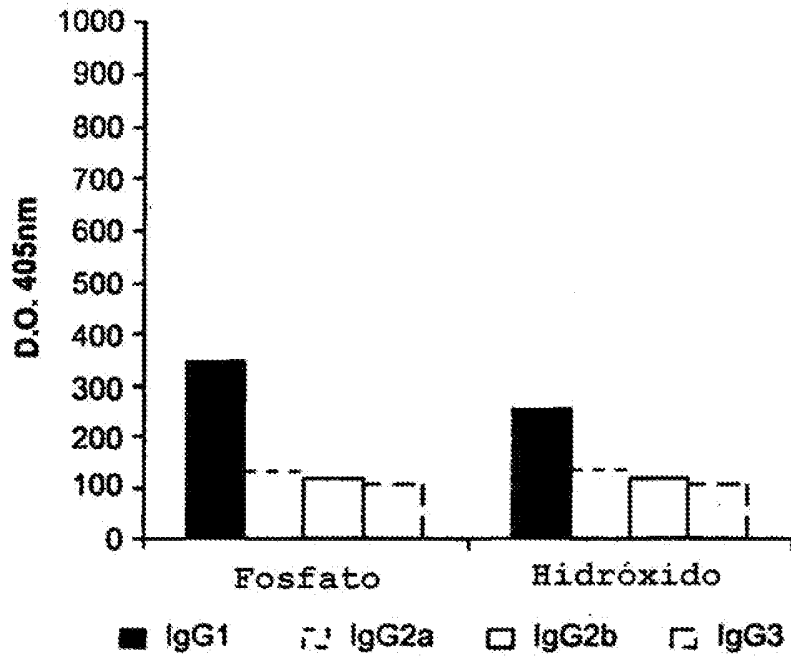
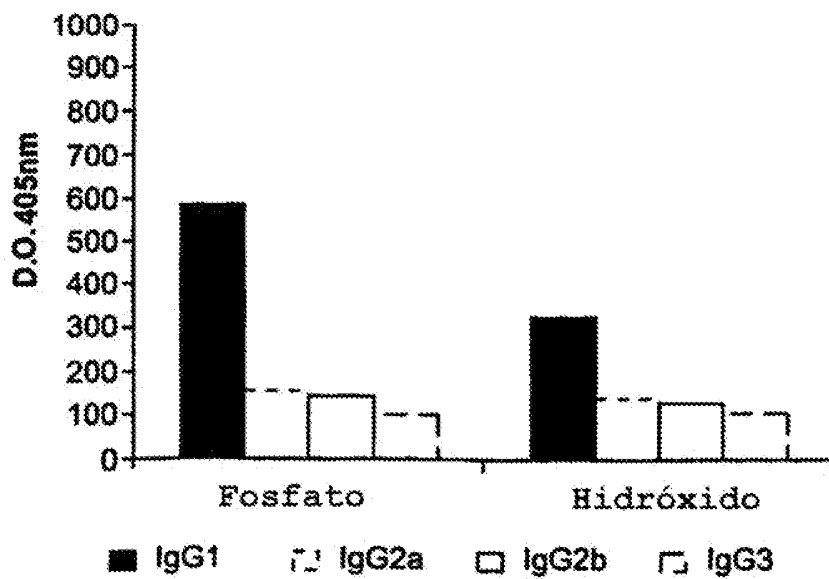


**FIG. 17A**

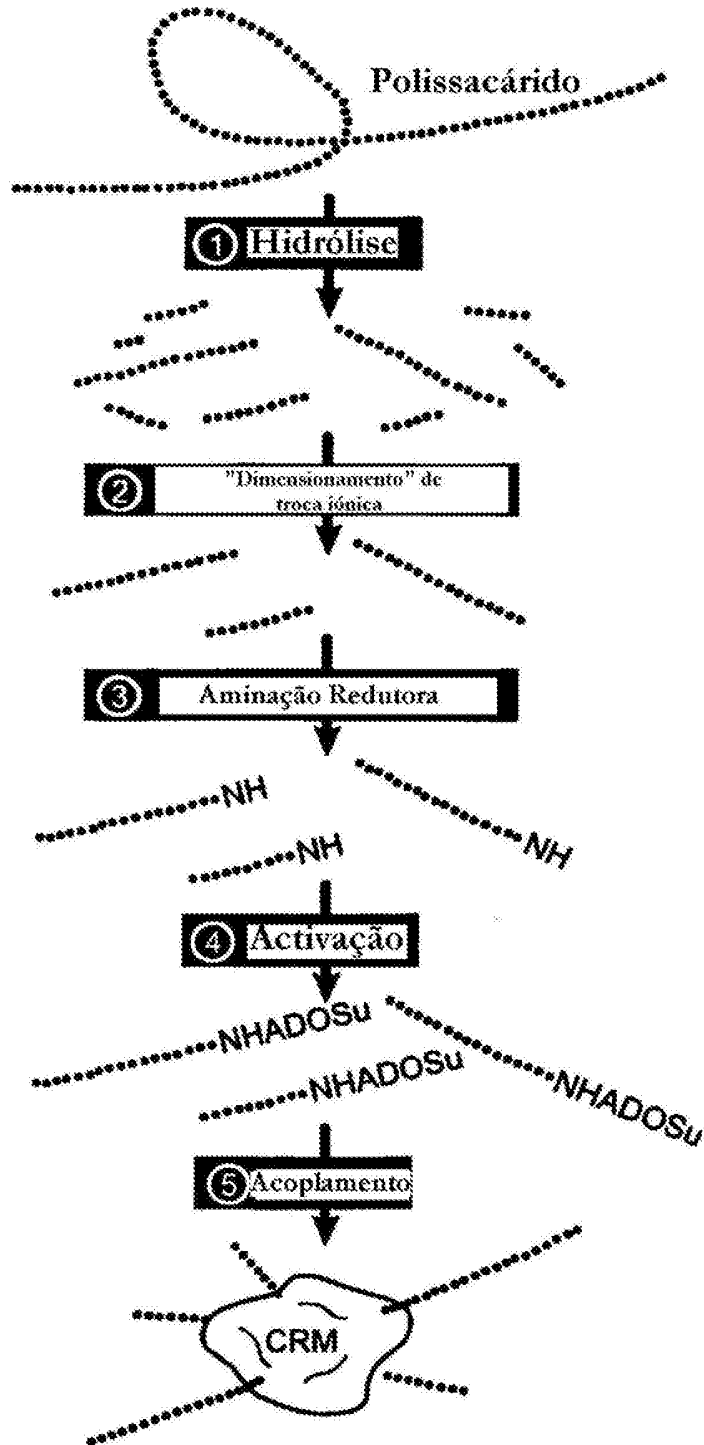


**FIG. 17B**

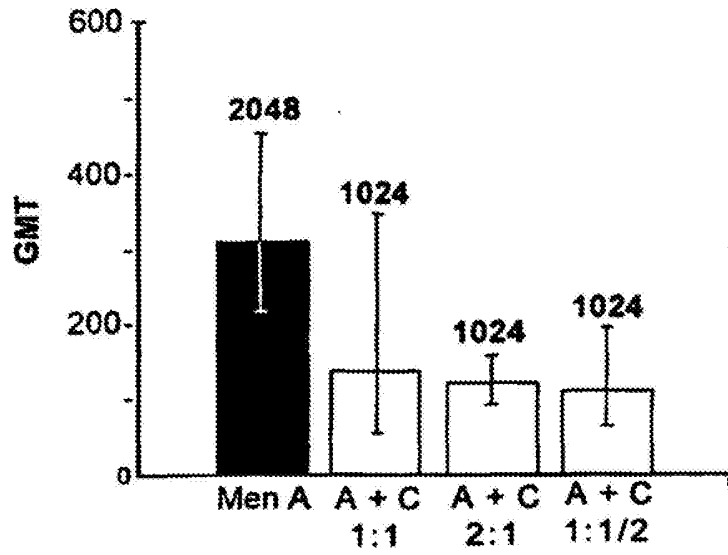


**FIG. 17C****FIG. 17D**

**FIG. 18**



**FIG. 19A**



**FIG. 19B**

