

**A61K 39/385** (2007.10) **A61K 39/39** (2007.10)  
**A61K 39/02** (2007.10) **A61K 39/05** (2007.10)  
**A61K 39/116** (2007.10) **A61P 31/04** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: <b>2000.03.17</b>	(73) Titular(es): <b>GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A.</b> <b>RUE DE L'INSTITUT 89 1330 RIXENSART</b> <b>BE</b>
(30) Prioridade(s): <b>1999.03.19 GB 9906437</b> <b>1999.04.20 GB 9909077</b> <b>1999.04.23 GB 9909466</b> <b>1999.07.15 GB 9916677</b>	(72) Inventor(es): <b>CARINE CAPIAU</b> <b>BE</b> <b>MARGUERITE DESCHAMPS</b> <b>BE</b> <b>PIERRE MICHEL DESMONS</b> <b>BE</b> <b>CRAIG ANTONY JOSEPH LAFERRIERE</b> <b>BE</b> <b>JAN POOLMAN</b> <b>BE</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2001.12.19</b>	(74) Mandatário: <b>PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2008.02.19</b> <b>057/2008</b>	

(54) Epígrafe: **VACINA CONTRA ANTIGÉNIOS DE BACTÉRIAS**

(57) Resumo:

## RESUMO

### "VACINA CONTRA ANTIGÉNIOS DE BACTÉRIAS"

A presente invenção refere-se ao campo das vacinas de antígeno polissacárido bacteriano. Em particular, a presente invenção refere-se a polissacáridos bacterianos conjugados a proteína D de *H. influenzae*.

## DESCRIÇÃO

### "VACINA CONTRA ANTIGÉNIOS DE BACTÉRIAS"

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a vacinas de antigénio polissacárido bacteriano, à sua preparação e à utilização de tais polissacáridos em medicamentos.

Em particular, a presente invenção refere-se a polissacáridos bacterianos conjugados, em geral, conjugados à proteína D de *H. influenzae*.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva responsável por uma morbidade e mortalidade considerável (particularmente em crianças e idosos), provocando doenças invasivas, tais como pneumonia, bacteremia e meningite e doenças associadas com colonização, tal como Otite média aguda. Estima-se que a taxa de pneumonia pneumocócica nos EUA para pessoas com mais de 60 anos de idade seja de 3 a 8 por 100000. Em 20% dos casos isto conduz a bacteremia e outras manifestações, tal como meningite, com uma taxa de mortalidade próxima de 30%, mesmo com tratamento com antibiótico.

A Pneumococos é encapsulada com um polissacárido ligado quimicamente que lhe confere uma especificidade serotípica.

Existem 90 serotipos conhecidos de pneumococos e a cápsula é o princípio virulento determinante para pneumococos, uma vez que a cápsula, não só protege a superfície interna da bactéria do complemento, mas ela própria é pouco imunogénica. Os polissacáridos são antigénios independentes de T e não podem ser processados ou apresentados em moléculas de MHC para interagir com as células T. No entanto, podem estimular o sistema imunitário através de um mecanismo alternativo que envolve a reticulação de receptores de superfície em células B.

Foi demonstrado em várias experiências que a protecção contra a doença pneumocócica invasiva está correlacionada com anticorpo específico para a cápsula e a protecção é específica para o serotipo.

As vacinas baseadas em antigénio polissacárido são bem conhecidas na técnica. Foram licenciadas quatro para utilização humana, incluindo o polissacárido Vi da *Salmonella typhi*, o polissacárido PRP de *Haemophilus influenzae*, a vacina meningocócica tetravalente composta pelos serotipos A, C, W135 e Y e a vacina pneumocócica 23-Valente, composta pelos polissacáridos correspondentes aos serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14,15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33 (constituindo, pelo menos, 90% dos isolados sanguíneos pneumocócicos).

As últimas três vacinas conferem protecção contra bactérias que provocam infecções respiratórias que resultam em morbidade e mortalidade grave em bebés, embora estas vacinas não tenham sido licenciadas para utilização em crianças com menos de dois anos de idade, porque são inadequadamente imunogénicas nesta faixa etária [Peltola et al. (1984), N. Engl. J. Med. 310: 1561-1566].

A *Streptococcus pneumoniae* é a causa mais comum de doença bacteriana invasiva e otite média em bebés e crianças. Do mesmo modo, os idosos estabelecem respostas fracas a vacinas pneumocócicas [Roghmann *et al.*, (1987), *J. Gerontol.* 42: 265-270], devido ao aumento da incidência de pneumonia bacteriana nesta população [Verghese e Berk, (1983) *Medicine (Baltimore)* 62: 271-285].

As estratégias que foram concebidas para ultrapassar esta lacuna na imunogenicidade em bebés, incluem a ligação de polissacáridos a grandes proteínas imunogénicas que proporcionam auxílio a células T espectadoras e que induzem memória imunológica contra o antigénio polissacárido, ao qual estão conjugadas. As vacinas conjugadas de glicoproteína pneumocócica estão actualmente a ser avaliadas para segurança, imunogenicidade e eficácia em várias faixas etárias.

#### **A) Vacinas Polissacáridas Pneumocócicas**

A vacina pneumocócica não conjugada 23-valente demonstrou uma vasta variação em eficácia clínica, desde 0% a 81% (Fedson *et al.* (1994) *Arch Intern Med.* 154: 2531-2535). A eficácia parece estar relacionada com o grupo de risco que está a ser imunizado, tais como os idosos, doença de Hodgkin, esplenectomia, doença das células falciformes e agamaglobulinémicos (Fine *et al.* (1994) *Arch Intern Med.* 154: 2666-2677) e, também, com a manifestação da doença. A vacina 23-valente não demonstrou protecção contra doenças como pneumonia pneumocócica (em determinados grupos de risco elevado, tal como os idosos) e otite média.

Existe, por isso, uma necessidade de composições para vacinas pneumocócicas melhoradas, particularmente, aquelas que sejam mais eficazes na prevenção ou melhoria da doença pneumocócica (particularmente, pneumonia) em idosos e crianças.

A presente invenção proporciona uma tal vacina melhorada.

### **B) Composições Seleccionadas de Conjugado Polissacárido Pneumocócico + 3D-MPL**

É aceite, de um modo geral, que a eficácia protectora da vacina pneumocócica não conjugada, comercializada, está mais ou menos relacionada com a concentração do anticorpo induzido após vacinação; de facto, os 23 polissacáridos foram aceites para licenciamento, somente após a imunogenicidade de cada componente polissacárido (Ed. Williams et al. New York Academy of Sciences 1995 pp. 241-249). Deste modo, o aumento suplementar das respostas dos anticorpos aos polissacáridos pneumocócicos poderá aumentar a percentagem de bebés e idosos que respondem, com níveis protectores de anticorpo, à primeira injeção de polissacárido ou conjugado de polissacárido e poderá reduzir a dosagem e número de injeções necessárias para induzir imunidade protectora a infecções provocadas por *Streptococcus pneumoniae*.

Desde o início do século 20, os investigadores experimentaram um grande número de compostos que podem ser adicionados a antigénios, para melhorar a sua imunogenicidade em composições de vacina [revisto em M. F. Powell & M. J. Newman, Plenum Press, NI, "Vaccine Design - the Subunit and Adjuvant Approach" (1995) Capítulo 7 "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients"]. Muitos são muito eficientes, mas provocam

reações sistémicas e locais adversas que impedem a sua utilização em composições para vacinas humanas. Os adjuvantes baseados em alumínio (tais como alumínio, hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio), descritos inicialmente em 1926, continuam a ser os únicos adjuvantes imunológicos utilizados em vacinas humanas licenciadas nos Estados Unidos.

Os adjuvantes baseados em alumínio são exemplos da classe de veículo adjuvante que funcionam através do “efeito depósito” que induz. O antigénio é adsorvido na sua superfície e quando a composição é injectada, o adjuvante e o antigénio não se dissipam imediatamente na corrente sanguínea - em vez disso, a composição permanece no ambiente local da injeção, resultando numa resposta imunitária mais pronunciada. Tais veículos adjuvantes apresentam uma vantagem adicional conhecida por serem adequados para estabilizar antigénios que são propícios a dissociação, por exemplo, alguns antigénios polissacáridos.

O 3D-MPL é um exemplo de veículo não adjuvante. O seu nome completo é lípido A de monofosforilo 3-O-desacilado (ou lípido A de monofosforilo 3-Des-O-acilado ou lípido A de 3-O-desacil-4'-monofosforilo) e é referido como 3D-MPL para indicar que a posição 3 da extremidade glucosamina redutora é des-O-acilada. Para a sua preparação, ver documento GB 2220211 A. Quimicamente é uma mistura de lípido A de monofosforilo 3-desacilado com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Foi preparado, originalmente, no início dos anos 90, quando o método de 3-O-desacilar o derivado 4'-monofosforilo de lípido A (MPL) conduziu a uma molécula com toxicidade atenuada adicional e sem alteração na actividade imunoestimuladora.

O 3D-MPL tem sido utilizado como um adjuvante por si só ou, de um modo preferido, combinado com um veículo adjuvante do tipo depósito, tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio ou emulsões óleo-em-água. Em tais composições, o antigénio e o 3D-MPL estão presentes nas mesmas estruturas particuladas, permitindo uma distribuição mais eficiente dos sinais imunoestimuladores e antigénicos. Estudos demonstraram que o 3D-MPL é capaz de melhorar também a imunogenicidade do antigénio adsorvido a alumínio [Thoelen *et al.* Vaccine (1998) 16: 708-14; documento EP 689454-B1]. Tais combinações são, também, preferidas na técnica, para antigénios que são susceptíveis a adsorção (por exemplo, conjugados de polissacáridos bacterianos), onde a adsorção em alumínio tende a estabilizar o antigénio. Os adjuvantes baseados em precipitados de alumínio são principalmente utilizados porque são os únicos adjuvantes que são utilizados actualmente em vacinas humanas licenciadas. Consequentemente, as vacinas contendo 3D-MPL em combinação com adjuvantes baseados em alumínio são favoritos na técnica, devido à sua facilidade de desenvolvimento e rapidez na introdução no mercado.

O MPL (**não** 3-desacilado) tem sido avaliado como um adjuvante com vários antigénios de vacina conjugados com polissacárido monovalente. A co-injecção de MPL em soro fisiológico aumenta a resposta do anticorpo no soro para quatro conjugados polissacáridos monovalentes: toxóide pneumocócico PS 6B do tétano, toxóide pneumocócico PS 12 da difteria e tipo 5 de *S. aureus* e tipo 8 de *S. aureus* conjugado a exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* [Schneerson *et al.* J. Immunology (1991) 147: 2136-2140]. As respostas aumentadas foram explicadas como sendo específicas para antigénio. O MPL numa emulsão óleo-em-água (um veículo do tipo adjuvante) aumenta

consistentemente o efeito do MPL em soro fisiológico devido à presença de MPL e antigénio na mesma estrutura particulada e foi considerado como sendo o sistema de adjuvante de eleição para uma distribuição óptima de outras vacinas conjugadas polissacáridas.

Devi *et al.* [Infect. Immun. (1991) 59: 3700-7] avaliaram o efeito adjuvante do MPL (não 3-desacilado) em soro fisiológico, na resposta com anticorpo de murinos a um conjugado TT de polissacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*. Quando o MPL foi utilizado simultaneamente com o conjugado, verificou-se apenas um aumento mínimo e ambas as respostas específicas IgM e IgG ao PS; no entanto, o MPL apresentou um efeito muito superior quando administrado 2 dias depois do conjugado. É questionável a viabilidade da utilização de um esquema de imunização que necessita de uma administração retardada de MPL relativamente ao antigénio, especialmente em bebés. O efeito adjuvante do MPL com polissacáridos e conjugados polissacárido-proteína, parece ser dependente da composição. Novamente, a incorporação de MPL em sistemas de distribuição de libertação lenta adequadas (por exemplo, utilizando um veículo adjuvante), proporcionam um efeito adjuvante de maior durabilidade e contornam o problema do timing e administração retardada.

Em resumo, o estado da técnica explica que, para um polissacárido ou antigénios conjugados a polissacárido particular, onde o MPL ou 3D-MPL são utilizados como um adjuvante, de um modo vantajoso, é utilizado em conjunto com um veículo adjuvante (por exemplo, os adjuvantes baseados em alumínio), de modo a maximizar o seu efeito imunoestimulador.

De um modo surpreendente, verificou-se que para determinados conjugados polissacáridos pneumocócicos, a imunogenicidade da composição da vacina é significativamente, superior quando o antigénio é formulado com 3D-MPL isolado, e não com 3D-MPL em conjunto com um veículo adjuvante (tal como um adjuvante baseado em alumínio). Além disso, a melhoria observada é independente da concentração de 3D-MPL utilizada e se os conjugados particulares estão numa composição monovalente ou se são combinados de modo a formarem uma composição polivalente.

### **C) Conjugados polissacárido-proteína D bacterianos**

Como mencionado acima, as vacinas baseadas em antigénio polissacárido são bem conhecidas na técnica. As vacinas polissacáridas licenciadas, mencionadas acima, têm diferentes eficácias clínicas demonstradas. Estima-se que a vacina polissacárida Vi tenha uma eficácia entre 55% e 77% na prevenção da febre tifóide, confirmada em cultura (Plotkin e Cam, (1995) Arch Intern Med 155: 2293-99). A vacina polissacárida C meningocócica demonstrou possuir uma eficácia de 79% sob condições epidémicas (De Wals P, et al. (1996) Bull World Health Organ. 74: 407-411). A vacina pneumocócica 23-valente apresentou uma ampla variação em eficácia clínica, desde 0% a 81% (Fedson et al. (1994) Arch Intern Med. 154: 2531-2535). Como mencionado acima, é aceite que a eficácia protectora da vacina pneumocócica esteja mais ou menos relacionada com a concentração de anticorpo induzido após vacinação.

Entre os problemas associados com a abordagem de polissacárido para vacinação, está o facto dos polissacáridos *per se* serem imunogénios fracos. As estratégias que foram

concebidas para ultrapassar esta falta de imunogenicidade incluem a ligação do polissacárido a grandes veículos proteicos altamente imunogénicos que proporcionam auxílio por células T espectadoras.

Exemplos destes veículos altamente imunogénicos que são actualmente utilizados, de um modo geral, para a produção de imunogénios polissacáridos incluem o toxóide da Difteria (DT ou o mutante CRM197, toxóide do Tétano (TT), Hemocianina de Lapa Californiana (KLH) e proteína purificada derivada de Tuberculina (PPD). Snapper *et al.*, (documento WO 96/32963) refere a co-administração de um antigénio com lipoproteína D. Akkoyunlu *et al.* (1997) refere conjugados de Proteína D-Hib. Lee *et al.*, (1997) refere a utilização de conjugados polissacárido-proteína pneumocócicos multivalentes como vacinas. Eskola *et al.*, (1990) estudou a administração de uma vacina conjugada polissacárido do tipo B de *Haemophilus influenzae* misturada com vacinas polissacáridas capsulares pneumocócicas e/ou meningocócicas. O documento WO 99/33488 (que é da técnica anterior sob o documento EPC Art 54(3), para esta invenção) revela formulações de vacina compreendendo vacinas conjugadas polissacáridas adjuvadas com um oligonucleótido CpG imunoestimulador.

#### *Problemas Associados com Veículos Geralmente Utilizados*

Estão associados vários problemas a cada destes veículos geralmente utilizados, incluindo na produção de conjugados GMP e também em características imunológicas dos conjugados.

Apesar da utilização comum destes veículos e do seu sucesso na indução de respostas com anticorpo anti-polissacárido, estão

associados a várias desvantagens. Por exemplo, sabe-se que as respostas imunes específicas para antigénio podem ser suprimidas (supressão do epitopo) através da presença de anticorpos pré-existentes direccionados contra o veículo, neste caso, toxina do Tétano (Di John *et al.*; (1989) *Lancet*, 2: 1415-8). Na população em geral, uma elevada percentagem de pessoas irá apresentar uma imunidade pré-existente a DT e TT, na medida em que as pessoas são vacinadas, por rotina, com estes antigénios. No R.U., por exemplo, 95% das crianças receberam a vacina DTP compreendendo o DT e o TT. Outros autores descreveram o problema da supressão de epitopo para vacinas peptídicas em modelos animais (Sad *et al.*, *Immunology*, 1991; 74: 223-227; Schutze *et al.*, *J. Immunol.* 135: 4, 1985; 2319-2322).

Além disso, para vacinas que necessitam de um reforço regular, a utilização de veículos altamente imunogénicos, tais como o TT e o DT são capazes de suprimir a resposta com anticorpo ao polissacárido após várias injeções. Estas vacinações múltiplas podem também ser acompanhadas por reacções indesejáveis, tal como hipersensibilidade do tipo retardada (DTH).

A KLH é conhecida como um imunogénio potente e foi já utilizada como um veículo para péptidos IgE em ensaios clínicos com humanos. No entanto, foram observadas algumas reacções adversas (reacções semelhantes ao DTH ou sensibilização por IgE), bem como respostas com anticorpo contra anticorpo.

Deste modo, a selecção de um veículo proteico para uma vacina baseada em polissacárido irá necessitar de um equilíbrio entre a necessidade de utilizar um veículo que funcione em todos os doentes (reconhecimento amplo de MHC), a indução de níveis

elevados de respostas de anticorpo anti-polissacárido e respostas de anticorpo reduzidas contra o veículo.

Deste modo, os veículos utilizados previamente para vacinas baseadas em polissacáridos, apresentam muitas desvantagens. Isto é, particularmente, verdadeiro em vacinas de combinação, onde a supressão do epitopo é especialmente problemática se é utilizado o mesmo veículo para vários antigénios polissacáridos. No documento WO 98/51339, foram utilizados vários veículos em vacinas de combinação de modo a tentar ultrapassar este efeito.

A presente invenção proporciona um novo veículo para utilização na preparação de conjugados imunogénicos baseados em polissacárido/polipéptido que não sofre das desvantagens mencionadas anteriormente.

A presente invenção proporciona uma proteína D (documento EP 0594610 B1) de *Haemophilus influenzae* ou os seus fragmentos, como um veículo para composições imunogénicas baseadas em polissacárido, incluindo vacinas. A utilização deste veículo é particularmente vantajosa em vacinas de combinação.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

### **A) Vacinas Polissacáridas Pneumocócicas**

Consequentemente, a presente divulgação descreve uma composição para vacina compreendendo, pelo menos, um antigénio polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* (de um modo preferido, conjugado) e um antigénio proteico de *Streptococcus pneumoniae* ou o seu equivalente imunologicamente funcional, opcionalmente,

com um adjuvante Th1 (um adjuvante que induz uma resposta imune Th1). De um modo preferido, estão incluídos uma proteína pneumocócica e adjuvante Th1. As composições da invenção são particularmente, adequadas para o tratamento de pneumonia em idosos.

As vacinas polissacáridas pneumocócicas (conjugadas ou não), podem não ser capazes de proteger contra a pneumonia na população mais idosa, para a qual a incidência desta doença é muito elevada. O mecanismo de defesa principal contra pneumococcus é a opsonofagocitose (um acontecimento mediado por células B humorais/neutrófilos, provocado pela produção de anticorpos contra o polissacárido pneumocócico, as bactérias tornam-se, eventualmente, fagocitadas), no entanto, partes dos mecanismos de opsonização envolvidos, estão debilitadas nos idosos, *i. e.*, a produção de superóxido por PMN (células polimorfonucleares), produção de outras espécies reactivas de oxigénio, mobilização de PMN, apoptose de PMN, deformabilidade de PMN. As respostas com anticorpo podem, também, estar debilitadas nos idosos.

Ao contrário do dogma normalmente aceite, os níveis normais de anticorpos anti-polissacárido capsulares podem não ser eficazes na remoção completa de bactérias, porque os pneumocócicos podem invadir células hospedeiras para evitarem esta ramificação do sistema imunitário.

De um modo surpreendente, os presentes requerentes verificaram que estimulando, simultaneamente, a ramificação do sistema imunitário mediada por células (por exemplo, imunidade mediada por células T) em adição à ramificação do sistema imunitário humoral (mediado por células B), resulta numa

sinergia (ou cooperação) que é capaz de aumentar a eliminação de bactérias pneumocócicas do hospedeiro. Isto é uma descoberta que irá auxiliar na prevenção (ou tratamento) de infecções pneumocócicas no geral, mas irá ser particularmente importante na prevenção (ou tratamento) de pneumonia nos idosos onde as vacinas baseadas em polissacáridos não demonstram eficácia.

Os presentes requerentes verificaram que ambas as ramificações do sistema imunitário podem deste modo funcionar em sinergia, se for administrado um polissacárido pneumocócico (de um modo preferido, conjugado) com uma proteína pneumocócica (de um modo preferido, uma proteína expressa na superfície da bactéria pneumocócica ou secretada ou libertada que pode ser processada e apresentada no contexto do MHC da Classe II e classe I na superfície de células de mamíferos infectados). Embora uma proteína pneumocócica possa activar a imunidade mediada por célula por si só, os requerentes verificaram também que a presença de um adjuvante de indução de Th1 na formulação da vacina ajuda esta ramificação do sistema imunitário e, de um modo surpreendente, potencia também a sinergia entre ambas as ramificações do sistema imunitário.

#### **B) Composições seleccionadas de Conjugado Polissacárido Pneumocócico + 3D-MPL**

Consequentemente, a presente divulgação descreve também uma composição antigénica compreendendo um ou mais conjugados polissacáridos pneumocócicos adjuvados com 3D-MPL e substancialmente desprovida de adjuvantes baseados em alumínio, em que, pelo menos, um dos conjugados polissacáridos pneumocócicos é, significativamente, mais imunogénico em

composições compreendendo 3D-MPL, em comparação com composições compreendendo 3D-MPL em conjunto com um adjuvante baseado em alumínio.

As formas de realização preferidas proporcionadas são composições antigénicas compreendendo conjugados de um ou mais dos seguintes polissacáridos capsulares pneumocócicos: serotipo 4, 6B, 18C, 19F e 23F. Em tais composições, cada dos polissacáridos são, de um modo surpreendente, mais imunogénicos em composições compreendendo o 3D-MPL isoladamente, em comparação com composições compreendendo o 3D-MPL e um adjuvante baseado em alumínio.

Assim, a presente divulgação descreve uma composição antigénica compreendendo o polissacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4, 6B, 18C, 19F ou 23F conjugado a uma proteína imunogénica e adjuvante 3D-MPL, em que a composição é substancialmente desprovida de adjuvantes baseados em alumínio.

Numa segunda forma de realização, a presente divulgação proporciona uma composição antigénica de combinação, substancialmente desprovida de adjuvantes baseados em alumínio e compreendendo o adjuvante 3D-MPL e dois ou mais conjugados polissacáridos pneumocócicos escolhidos de um grupo consistindo de: serotipo 4; serotipo 6B; serotipo 18C; serotipo 19F e serotipo 23F.

### **C) Conjugados de polissacárido-proteína D bacterianos**

Consequentemente, a presente invenção proporciona uma composição imunogénica compreendendo vários antigénios polissacáridos que consistem num antigénio polissacárido derivado de uma bactéria patogénica, conjugado a proteína D de *Haemophilus influenzae* ou um seu fragmento de proteína D.

### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

#### **A) Vacinas polissacáridas Pneumocócicas**

A presente invenção proporciona uma vacina melhorada, particularmente para a prevenção ou melhoria de infecção pneumocócica em idosos (e/ou bebés e crianças).

No contexto da invenção, um doente é considerado idoso se tiver 55 anos de idade ou mais, tipicamente, mais de 60 anos e, de um modo mais geral, mais de 65 anos.

Assim, numa forma de realização da divulgação, é proporcionada uma composição de vacina, adequada para utilização em idosos (e/ou bebés e crianças), compreendendo, pelo menos, um antigénio polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* e, pelo menos, um antigénio proteico de *Streptococcus pneumoniae*.

Numa segunda forma de realização preferida, a presente divulgação descreve uma vacina (adequada para a prevenção de pneumonia em idosos), compreendendo, pelo menos, um antigénio polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* e, pelo menos, um

antigénio proteico de *Streptococcus pneumoniae* e um adjuvante Th1.

Considera-se que tal vacina também será útil no tratamento de infecção pneumocócica (por exemplo, otite média) noutros grupos de elevado risco da população, tais como bebés ou crianças.

Numa terceira forma de realização, é proporcionada uma composição de vacina compreendendo um antigénio polissacárido pneumocócico e um adjuvante Th1.

#### Antigénios Polissacáridos de *Streptococcus pneumoniae* da Invenção

Tipicamente, a vacina de *Streptococcus pneumoniae* da presente invenção irá compreender antigénios polissacáridos conjugados, em que os polissacáridos são derivados de, pelo menos, quatro serotipos de pneumococos. De um modo preferido, os quatro serotipos incluem 6B, 14, 19F e 23F. De um modo mais preferido, estão incluídos na composição, pelo menos, 7 serotipos, por exemplo, aqueles derivados dos serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. De um modo ainda mais preferido, estão incluídos na composição, pelo menos, 11 serotipos, por exemplo, a composição numa forma de realização inclui polissacáridos capsulares derivados dos serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F (de um modo preferido, conjugados). Numa forma de realização preferida da invenção, estão incluídos, pelo menos, 13 antigénios polisacáridos conjugados, embora sejam contemplados pela invenção outros antigénios polissacáridos, por exemplo 23-valente (tais como os serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B,

7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F).

Para a vacinação de idosos (por exemplo, para a prevenção de pneumonia) é vantajoso incluir os serotipos 8 e 12F (e, de um modo mais preferido, também o 15 e 22) à composição antigénica 11-valente descrita acima, para formar uma vacina 15-valente enquanto, para bebés e crianças (onde a otite média é mais problemática), são incluídos, de um modo vantajoso, os serotipos 6A e 19A para formar uma vacina 13-valente.

Para a prevenção/melhoria da pneumonia na população de idosos (+55 anos) e Otite média em bebés (até 18 meses) e crianças (tipicamente, 18 meses a 5 anos), é uma forma de realização preferida da invenção, combinar um polissacárido de *Streptococcus pneumonia* multivalente, como aqui descrito, com uma proteína de *Streptococcus pneumoniae* ou seu equivalente imunologicamente funcional.

#### Proteínas Pneumocócicas

Para os objectivos desta divulgação, “equivalente imunologicamente funcional” é definido como um péptido de proteína, compreendendo, pelo menos, um epitopo protector das proteínas da divulgação. Tais epitopos estão, de um modo característico, expostos à superfície, altamente conservados e podem induzir uma resposta com anticorpo bactericida num hospedeiro ou prevenir efeitos tóxicos. De um modo preferido, o equivalente funcional apresenta, pelo menos, 15 e, de um modo preferido, 30 ou mais aminoácidos contíguos a partir da proteína da divulgação. De um modo muito preferido, podem ser utilizados

fragmentos, deleções da proteína, tais como as suas variantes de deleção transmembranares (i. e., a utilização do domínio extracelular das proteínas), fusões, derivados quimicamente ou geneticamente desintoxicados e semelhantes, com a condição de que sejam capazes de elevar substancialmente a mesma resposta imunitária que a proteína nativa.

As proteínas preferidas são aquelas proteínas pneumocócicas da invenção que estão expostas na superfície externa de pneumococos (capazes de serem reconhecidas pelo sistema imunitário do hospedeiro em, pelo menos, parte do ciclo de vida dos pneumococos) ou são proteínas que são secretadas ou libertadas pelos pneumococos. De um modo muito preferido, a proteína é uma toxina, adesina, tradutor de sinal de 2 componentes ou lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae* ou os seus equivalentes imunologicamente funcionais.

As proteínas particularmente preferidas a serem incluídas em tal vacina de combinação, incluem, mas não estão limitadas a: pneumolisina (de um modo preferido, desintoxicada por tratamento químico ou mutação) [Mitchell *et al.* Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.", Mitchell *et al.* Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007(1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties.", documento WO 96/05859 (A. Cyanamid), documento WO 90/06951 (Paton *et al.*), documento WO 99/03884 (NAVA)]; A PspA e as suas variantes transmembranares de deleção (documento US 5804193-Briles *et al.*); PspC e as suas variantes transmembranares de deleção (documento WO 97/09994-Briles *et al.*); PsaA e as suas variantes transmembranares de deleção (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64 (12): 5255-62

"Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"; proteínas de ligação a colina pneumocócica e as suas variantes transmembranares de deleccção; CbpA e as suas variantes transmembranares de deleccção (documento WO 97/41151; documento WO 99/51266); Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Infect. Immun. 1996 64: 3544); HSP70 (documento WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato *et al.* *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164: 207-14); Proteína semelhante a M, pedido de patente N° EP 0837130 da SB; e adesina 18627, Pedido de patente N° EP 0834568 da SB.

As proteínas utilizadas na presente divulgação são, de um modo preferido, seleccionadas do grupo pneumolisina, PsaA, PspA, PspC, CbpA ou uma combinação de duas ou mais de tais proteínas. A presente divulgação engloba, também, equivalentes imunologicamente funcionais de tais proteínas (como definido acima).

No interior da composição, a proteína pode auxiliar a induzir uma resposta mediada por células T contra doença pneumocócica - particularmente necessária para protecção contra pneumonia - que cooperam com a ramificação humoral do sistema imunitário, para inibir a invasão por pneumocócicos e para estimular a fagocitose por opsonização.

Outras vantagens em incluir o antigénio proteico são a apresentação de outros antigénios para o processo de fagocitose por opsonização e a inibição da adesão bacteriana (se for utilizada uma adesina) ou a neutralização de toxina (se for utilizada uma toxina).

Consequentemente, numa forma de realização é proporcionada uma vacina de *Streptococcus pneumoniae*, compreendendo uma vacina polissacárida pneumocócica conjugada, compreendendo antigénios polissacáridos derivados de, pelo menos, quatro serotipos, de um modo preferido, pelo menos, sete serotipos, de um modo mais preferido, pelo menos, onze serotipos e, pelo menos, um, mas de um modo preferido, duas proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. De um modo preferido, uma das proteínas é Pneumolisina ou PsaA ou PspA ou CbpA (de um modo muito preferido, pneumolisina desintoxicada). Uma combinação preferida contém, pelo menos, pneumolisina ou um seu derivado e PspA.

Como mencionado acima, um problema associado com a abordagem de polissacárido à vacinação, é o facto de que esses polissacáridos *per se* serem imunogénios fracos. Para ultrapassar isto, os polissacáridos podem ser conjugados a veículos proteicos que proporcionam auxílio a células T espectadoras. Deste modo, é preferido que os polissacáridos utilizados na invenção estejam ligados a tal veículo proteico. Exemplos de tais veículos que são normalmente utilizados para a produção de imunogénios polissacáridos incluem toxóides de Difteria e Tétano (DT, DT CRM197 e TT, respectivamente), Hemocianina de Lapa californiana (KLH), OMPC de *N. meningitidis* e o derivado proteico purificado de Tuberculina (PPD).

No entanto, estão associados vários problemas com cada destes veículos normalmente utilizados (ver secção "Problemas Associados com Veículos Normalmente Utilizados" acima).

A presente invenção proporciona, numa forma de realização preferida, um novo veículo para utilização na preparação de construtores imunogénicos baseados em polissacáridos, que não

sofrem destas desvantagens. O veículo preferido para composições imunogénicas baseadas em polissacárido pneumocócico (ou vacinas) é a proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento EP 594610-B) ou os seus fragmentos. Os fragmentos adequados para utilização incluem fragmentos englobando epitopos de células T de auxílio. Em particular, um fragmento de proteína D irá, de um modo preferido, conter 1/3 do N-terminal da proteína.

Outro veículo preferido para o polissacárido pneumocócico é a própria proteína pneumocócica (como definido acima na secção "Proteínas Pneumocócicas")

As vacinas da presente invenção são, de um modo preferido, adjuvadas. Os adjuvantes adequados incluem um sal de alumínio, tais como gel de hidróxido de alumínio (alúmem) ou fosfato de alumínio, mas também pode ser um sal de cálcio, ferro ou zinco, ou podem ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada ou açúcares acilados, polissacáridos cationicamente ou anionicamente derivatizados ou polifosfazenos.

É preferido, que o adjuvante seja seleccionado como sendo um indutor preferencial de uma resposta do tipo TH1, para auxiliar a ramificação da resposta imunitária mediada por células.

#### Adjuvantes TH1 da Invenção

Níveis elevados de citocinas do tipo Th1 tendem a favorecer a indução de respostas imunitárias mediadas por células a um determinado antigénio, enquanto níveis elevados de citocinas do

tipo Th2 tendem a favorecer a indução de respostas imunitárias humorais ao antigénio.

É importante lembrar que a distinção das respostas imunitárias do tipo Th1 e Th2 não é absoluta. Na realidade, um individuo irá suportar uma resposta imunitária que é descrita como sendo predominantemente Th1 ou predominantemente Th2. No entanto, é muitas vezes conveniente considerar as famílias de citocinas em termos do descrito em clones de célula T CD4 +ve de murinos por Mosmann and Coffman (Mosmann, T. R. w Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p 145-173). Normalmente, as repostas do tipo Th1 estão associadas com a produção de citocinas INF- $\gamma$  e IL-2 pelos linfócitos T. Outras citocinas muitas vezes associadas directamente com a indução de respostas imunitárias do tipo Th1 não são produzidas pelas células T, tais como as IL-12. Em contraste, as repostas do tipo TH2 estão associadas com a secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Os sistemas de adjuvante adequados que promovem uma resposta predominantemente Th1 incluem lípido A de monofosforilo ou um seu derivado, particularmente, lípido A de monofosforilo 3-des-O-acilado e uma combinação de lípido A de monofosforilo, de um modo preferido, lípido A de monofosforilo 3-des-O-acilado (3D-MPL) em conjunto com um sal de alumínio.

Um sistema melhorado envolve a combinação de um lípido A de monofosforilo e um derivado de saponina, particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL, como revelado no documento WO94/00153 ou uma composição menos reactogénica onde o QS21 é inactivado com colesterol, como revelado no documento WO 96/33739.

Uma formulação de adjuvante particularmente potente, envolvendo QS21, 3D-MPL e tocoferol numa emulsão óleo em água é descrita no documento WO 95/17210 e é uma formulação preferida.

De um modo preferido, a vacina compreende, adicionalmente, uma saponina, de um modo mais preferido, QS21. A formulação pode também compreender uma emulsão óleo em água e tocoferol (documento WO 95/17210).

A presente invenção proporciona também um método para produzir uma formulação de vacina compreendendo misturar uma proteína da presente invenção em conjunto com um excipiente farmacologicamente aceitável, tal como 3D-MPL.

O CpG não metilado contendo oligonucleótidos (documento WO 96/02555) são também indutores preferidos de uma resposta TH1 e são adequados para utilização na presente invenção.

As composições particularmente preferidas da divulgação compreendem um ou mais polissacáridos pneumocócicos conjugados, uma ou mais proteínas pneumocócicas e um adjuvante Th1. A indução de uma resposta mediada por células através de uma proteína pneumocócica (como descrito acima) e a cooperação entre ambas as ramificações do sistema imunitário podem ser auxiliadas utilizando tal adjuvante Th-1, resultando numa vacina particularmente eficaz contra a doença pneumocócica no geral e, de um modo importante, contra pneumonia pneumocócica em idosos.

Noutro aspecto da presente invenção, é proporcionado um imunogénio ou vacina, como aqui descrito, para utilização em medicina.

Ainda noutro aspecto da invenção, é proporcionada uma composição compreendendo um conjugado polissacárido pneumocócico e um adjuvante Th1 (de um modo preferido, 3D-MPL) que é capaz de seroconverter ou induzir uma resposta humoral com anticorpo contra o antigénio polissacárido dentro de uma população de não-resposta.

10-30% da população é conhecida por ser de não-resposta à imunização polissacárida (não respondem a mais de 50% dos serotipos numa vacina) (Konradsen *et al.*, *Scand. J. Immun* 40: 251 (1994); Rodriguez *et al.*, *JID*, 173: 1347 (1996)). Isto pode também ser o caso para as vacinas conjugadas (Musher *et al.* *Clin. Inf. Dis.* 27: 1487 (1998)). Isto pode ser particularmente grave para áreas da população de elevado risco (bebés, crianças e os idosos).

Os presentes requerentes verificaram que uma combinação de um polissacárido pneumocócico conjugado (que é propício a resposta fraca numa população em particular) com um adjuvante Th1 (ver "adjuvantes Th1 da invenção" acima), pode, de um modo surpreendente, ultrapassar esta ausência de resposta. De um modo preferido, o 3D-MPL deverá ser utilizado e, de um modo muito preferido, o adjuvante baseado em alumínio desprovido de 3D-MPL (que proporciona ainda, uma melhor resposta). A presente invenção proporciona assim tais composições e, proporciona ainda uma utilização de um adjuvante Th1 na preparação de um medicamento compreendendo antigénios polissacáridos pneumocócicos conjugados para o tratamento contra (ou protecção de) doença pneumocócica em indivíduos que são de não-resposta ao antigénio polissacárido.

Numa forma de realização está incluída uma utilização de uma quantidade eficaz e segura de um antigénio polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* e um adjuvante Th1 ou uma proteína pneumocócica (e, de um modo preferido, ambos), para os referidos doentes idosos

Noutra forma de realização, é proporcionada uma utilização de uma quantidade eficaz e segura de um antigénio polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* e um antigénio proteico de *Streptococcus pneumoniae* ou um adjuvante Th1 (e, de um modo preferido, ambos), na preparação de uma vacina para a prevenção ou melhoria de otite média em bebés e crianças.

Nos métodos da invenção, como descritos acima, o antigénio polissacárido está presente como um conjugado polissacárido-proteína.

#### *Preparações de Vacina da Invenção*

As preparações de vacinas da presente invenção podem ser utilizadas para proteger ou tratar um mamífero susceptível a infecção, através da administração da referida vacina através da via sistémica ou mucosal. Estas administrações podem incluir injeção através das vias intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea; ou via administração mucosal nos tractos oral/alimentar, respiratório, genitourinário. É preferida a administração intranasal de vacinas para o tratamento de pneumonia ou otite média (uma vez que na medida em que o transporte nasofaríngeal de pneumococos pode ser prevenido de um modo mais eficaz, atenuando assim a infecção na sua fase mais inicial).

A quantidade de antigénio conjugado em cada dose de vacina é seleccionada como uma quantidade que induz uma resposta imunoprotectora sem efeitos secundários adversos significativos em vacinas típicas. Tal quantidade irá variar dependendo do imunogénio específico empregue e de como é apresentando. Geralmente, espera-se que cada dose irá compreender 0,1-100 µg de polissacárido, de um modo preferido, 0,1-50 µg, de um modo preferido, 0,1-10 µg, das quais 1 a 5 µg é a gama mais preferida.

O conteúdo em antigénios proteicos na vacina irá, tipicamente, estar na gama 1-100 µg, de um modo preferido, 5-50 µg, mais tipicamente, na gama de 5-25 µg.

As quantidades óptimas dos componentes para uma vacina em particular, podem ser determinados através de estudos convencionais envolvendo a observação de respostas imunes apropriadas em indivíduos. Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber uma ou várias imunizações de reforço com intervalos adequados

A preparação da vacina é, geralmente, descrita em Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press, Nova Iorque). A encapsução em lipossomas é descrita por Fullerton, Patente US 4235877.

## **B) Composições seleccionadas de Conjugado Polissacárido Pneumocócico + 3D-MPL**

Para os objectivos desta divulgação, o termo "conjugados polissacáridos pneumocócicos da divulgação", descreve os

conjugados de polissacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* que são mais imunogénicos em composições compreendendo 3D-MPL, em comparação com composições compreendendo 3D-MPL em conjunto com um adjuvante baseado em alumínio (por exemplo, conjugados do serotipo 4; serotipo 6B; serotipo 18C; serotipo 19F ou serotipo 23F).

Para os objectivos desta divulgação, o termo "substancialmente desprovido de adjuvantes baseados em alumínio", descreve uma composição que não contém adjuvante baseado em alumínio suficiente (por exemplo, hidróxido de alumínio e, de um modo particular, fosfato de alumínio) para provocar qualquer diminuição na imunogenicidade de um conjugado polissacárido pneumocócico da divulgação, em comparação com uma composição equivalente compreendendo 3D-MPL sem adjuvante baseado em alumínio adicionado. De um modo preferido, a composição antigénica deverá conter adjuvante que consiste essencialmente de 3D-MPL. As quantidades de adjuvante baseado em alumínio adicionadas por dose deverão, de um modo preferido, ser inferiores a 50 µg, de um modo mais preferido, inferiores a 30 µg, de um modo ainda mais preferido, inferiores a 10 µg e um modo muito preferido, não existe adjuvante baseado em alumínio adicionado às composições antigénicas da divulgação.

Para os objectivos desta divulgação, a determinação se um conjugado polissacárido pneumocócico é, significativamente, mais imunogénico nas composições compreendendo 3D-MPL em comparação com composições compreendendo 3D-MPL em conjunto com um adjuvante baseado em alumínio, deverá ser estabelecida como descrito no Exemplo 2. Como uma indicação de que uma composição é, significativamente, mais imunogénica quando compreende o 3D-MPL isolado, a taxa de concentração de IgG de GMC (como

determinado no Exemplo 2) entre composições compreendendo 3D-MPL isolado *versus* uma composição equivalente compreendendo 3D-MPL em conjunto com adjuvante de fosfato de alumínio, deverá ser superior a 2, de um modo mais preferido, superior a 5, de um modo mais preferido, superior a 7, ainda de um modo mais preferido, superior a 9 e de um modo muito preferido, superior a 14.

Entre os problemas associados com a abordagem polissacárida em vacinação, está o facto de que os polissacáridos *per se* serem imunogénios fracos. As estratégias que foram concebidas para ultrapassar esta falta de imunogenicidade, incluem a ligação (conjugação) do polissacárido a grandes veículos proteicos que proporcionam auxílio por células T espectadoras. É preferido que os polissacáridos pneumocócicos da invenção estejam ligados a um veículo proteico que proporciona auxílio por células T espectadoras. Exemplos de tais veículos que podem ser utilizados incluem os tóxicos de Difteria, Difteria mutante e Tétano (DT, CRM197 e TT, respectivamente), Hemocianina de Lapa Californiana (KLH), o derivado proteico purificado de Tuberculina (PPD) e OMPC de *Neisseria meningitidis*.

A proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento EP 0594610-B) ou os seus fragmentos (ver secção C), é utilizada como o veículo proteico imunogénico para os polissacáridos pneumocócicos da invenção.

Numa forma de realização, a composição antigénica da divulgação compreende polissacárido pneumocócico serotipo (PS) 4 conjugado a uma proteica imunogénica e formulado com adjuvante 3D-MPL, onde a composição é, substancialmente, desprovida de adjuvante baseado em alumínio. Noutras formas de realização, a

composição antigénica compreende PS 6B, 18C, 19F ou 23F, respectivamente, conjugados a uma proteína imunogénica e formulados com adjuvante 3D-MPL, onde a composição é substancialmente desprovida de adjuvante baseado em alumínio.

Ainda noutra forma de realização da divulgação, é proporcionada uma composição antigénica de combinação compreendendo dois ou mais conjugados polissacáridos pneumocócicos do grupo PS 4, PS 6B, PS 18C, PS 19F e PS 23F, formulados com adjuvante 3D-MPL, onde a composição é substancialmente desprovida de adjuvante baseado em alumínio.

A imunogenicidade dos conjugados polissacáridos pneumocócicos da divulgação não é significativamente afectada por combinação com outros conjugados polissacáridos pneumocócicos (Exemplo 3). Consequentemente, um aspecto preferido da divulgação proporciona uma composição antigénica de combinação compreendendo um ou mais conjugados polissacáridos pneumocócicos da divulgação, em combinação com mais um ou mais conjugados polissacáridos pneumocócicos, onde a composição é formulada com adjuvante 3D-MPL, mas é substancialmente desprovida de adjuvante baseado em alumínio.

Noutras formas de realização preferidas da divulgação, são proporcionadas composições antigénicas de combinação que contêm, pelo menos, um e, de um modo preferido, 2, 3, 4 ou os 5 de PS 4, 6B, 18C, 19F ou 23F conjugados polissacáridos pneumocócicos e, além disso, qualquer combinação de outros conjugados polissacáridos pneumocócicos que são formulados com adjuvante 3D-MPL, mas, significativamente, desprovidos de adjuvante baseado em alumínio.

Tipicamente, a composição antigénica de combinação de *Streptococcus pneumoniae* da presente invenção, irá compreender antigénios conjugados de polissacárido, em que os polissacáridos são derivados de, pelo menos, quarto, sete, onze, treze, quinze ou vinte e três serotipos (ver "Antigénios Polissacáridos de *Streptococcus pneumoniae* da Invenção" acima, para combinações preferidas de serotipos, dependendo da doença a ser tratada.

As composições antigénicas da invenção são, de um modo preferido, utilizadas como composições de vacinas para prevenir (ou tratar) infecções pneumocócicas, particularmente, em idosos, bebés e crianças.

Outras formas de realização da presente invenção incluem: a preparação das composições antigénicas anteriores para utilização em medicina; e a utilização de uma das composições antigénicas anteriores na preparação de um medicamento para a prevenção (ou tratamento) de doença pneumocócica.

Para a prevenção/melhoria de pneumonia na população de idosos (+ 55 anos) e Otite média em Bebés (até aos 18 meses) e crianças (tipicamente, 18 meses até 5 anos), é uma outra forma de realização preferida, combinar um conjugado polissacárido de *Streptococcus pneumoniae* multivalente, formulado como aqui descrito, com uma proteína de *Streptococcus pneumoniae* ou seu equivalente imunologicamente funcional. Ver acima secção "Proteínas Pneumocócicas" para combinações proteínas/proteína preferidas.

De um modo preferido, as composições antigénicas (e vacinas), aqui descritas anteriormente, são liofilizadas até serem utilizadas, período no qual são reconstituídas

extemporaneamente com diluente. De um modo mais preferido, são liofilizadas na presença de 3D-MPL e são extemporaneamente reconstituídas com soro fisiológico.

A liofilização das composições, resulta numa composição mais estável (por exemplo, previne a degradação dos antigénios polissacáridos). O processo é, também, de um modo surpreendente, responsável por um título em anticorpo superior contra os polissacáridos pneumocócicos. Isto foi demonstrado como sendo particularmente significativo para os conjugados 6B PS. Outro aspecto da divulgação é, assim, uma composição antigénica liofilizada compreendendo um conjugado 6B PS adjuvado com 3D-MPL e substancialmente desprovido de adjuvantes baseados em alumínio.

Para a preparação de vacinas, ver acima secção "Preparações de Vacinas da Invenção".

### **C) Conjugados polissacárido-proteína D bacterianos**

A tendência em direcção a vacinas de combinação apresenta a vantagem de reduzir o desconforto do receptor, facilita a programação e garante a conclusão do regime; mas existe também o risco concomitante de redução da eficácia da vacina (ver acima a discussão sobre a supressão do epitopo através da utilização excessiva de veículos proteicos). Deste modo, seria vantajoso preparar vacinas de combinação que vão de encontro às necessidades de uma população e que, além disso, não exibem interferência imunogénica entre os seus componentes. Estas vantagens podem ser alcançados através de composições imunogénicas (ou vacinas) da invenção, que são de benefício

particular para administração de vacinas de combinação a grupos de elevado risco, tais como bebés, crianças ou os idosos.

A presente invenção proporciona uma proteína D de *Haemophilus influenzae* ou os seus fragmentos, como um veículo para composição imunogénica baseada em polissacáridos, incluindo vacinas. Os fragmentos adequados para utilização incluem fragmentos englobando epitopos de células T de auxílio. Em particular, o fragmento da proteína D irá, de um modo preferido, conter 1/3 do N-terminal da proteína.

A proteína D é uma proteína de ligação a IgD de *Haemophilus influenzae* (documento EP 0594610 B1) e é um imunogénio potente.

Os polissacáridos que podem ser conjugados a Proteína D contemplados pela presente invenção incluem, mas não estão limitados ao antigénio polissacárido Vi contra *Salmonella typhi*, polissacáridos meningocócicos (incluindo o tipo A, C, W135 e Y e o polissacárido e polissacáridos modificados do grupo meningococos B), polissacáridos de *Staphylococcus aureus*, polissacáridos de *Streptococcus agalactae*, polissacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, polissacáridos de Micobactéria, e. g., *Mycobacterium tuberculosis* (tais como, manofosfoinositidos trealose, ácido micólico, arabinomananos revestidos com manose, a sua cápsula e arabinogalactanos), polissacárido de *Cryptococcus neoformans*, os lipopolissacáridos de *Haemophilus influenzae* não-tipável, o polissacárido capsular de *Haemophilus influenzae* b, os lipopolissacáridos de *Moraxella catharralis*, os lipopolissacáridos de *Shigella sonnei*, o lipopeptidofosfoglicano (LPPG) de *Trypanosoma cruzi*, os gangliósidos GD3 e GD2, associados ao cancro, as mucinas associadas a tumor, especialmente o antigénio T-F e o antigénio sialilo T-F e o

polissacárido associado ao VIH que está estruturalmente relacionado com o antigénio T-F.

O polissacárido pode ser ligado ao veículo proteico através de qualquer método conhecido (por exemplo, por Likhite, Patente U.S. 4372945 e por Armor *et al.*, Patente U.S. 4474757). De um modo preferido, é efectuada a conjugação de CDAP (documento WO 95/08348).

No CDAP, o reagente de cianilação de tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridínio (CDAP) é, de um modo preferido, utilizado para a síntese de conjugados polissacárido-proteína. A reacção de cianilação pode ser efectuada sob condições relativamente moderadas, que evita a hidrólise dos polissacáridos sensíveis a meio alcalino. Esta síntese permite a ligação directa ao veículo proteico.

O polissacárido é solubilizado em água ou numa soro fisiológico. O CDAP é dissolvido em acetonitrilo e adicionado imediatamente à solução de polissacárido. O CDAP reage com os grupos hidroxilo do polissacárido para formar um éster de cianato. Após o passo de activação, é adicionada o veículo proteico. Os grupos amino da lisina reagem com o polissacárido activado para formar uma ligação covalente de isoureia.

Após a reacção de ligação é, depois, adicionado um grande excesso de glicina para inactivar as funções residuais activadas. O produto é depois passado através de um gel de permeação para remover o veículo proteico que não reagiu e reagentes residuais. Consequentemente, a invenção proporciona um método de produção de conjugados polissacárido-proteína D,

compreendendo os passos de activação do polissacárido e ligação do polissacárido à proteína D.

Numa forma de realização preferida da invenção, é proporcionada uma formulação de composição imunogénica (ou vacina), para a prevenção de infecções por *Streptococcus pneumoniae*.

Os mecanismos através dos quais os pneumocócicos se espalham até aos pulmões, líquido cefalorraquidiano e sangue são pouco compreendidos. O crescimento da bactéria que atinge os alvéolos pulmonares normais é inibido pela sua secra relativa e pela actividade fagocítica dos macrófagos alveolares. Quaisquer alterações anatómicas ou fisiológicas destas defesas coordenadas tendem a aumentar a susceptibilidade dos pulmões a infecção. A parede celular de *Streptococcus pneumoniae* tem uma função importante na formação da resposta inflamatória nos alvéolos dos pulmões (Gillespie et al. (1997), I & I 65: 3936).

Tipicamente, a vacina de *Streptococcus pneumoniae* da presente invenção irá compreender conjugados de proteína D-polissacárido, em que o polissacárido deriva de, pelo menos, quatro, sete, onze, treze, quinze ou 23 serotipos. Ver acima "Antigénios Polissacáridos de *Streptococcus pneumoniae* da Invenção", para combinações preferidas de serotipos, dependendo da doença a ser tratada.

Noutra forma de realização da invenção, é proporcionada uma vacina para *Neisseria meningitidis*; em particular dos serotipos A, B, C W-135 e Y. A *Neisseria meningitidis* é uma das causas mais importantes de meningite bacteriana. A cápsula de hidratos de carbono destes organismos pode actuar como um determinante de

virulência e um alvo para anticorpo de protecção. Contudo, os hidratos de carbono são bem conhecidos, como sendo fracos imunogénios para crianças jovens. A presente invenção proporciona um veículo proteico, particularmente, adequado para estes polissacáridos, proteína D, que proporcionam epitopos para células T, que podem activar uma resposta de células T, para auxiliar a proliferação e maturação de células B específicas para antigénio polissacárido, bem como a indução de uma memória imunológica.

Numa forma de realização alternativa da invenção, é proporcionado um conjugado polissacárido capsular de *Haemophilus influenzae b* (PRP)-proteína D.

A presente invenção contempla, também, vacinas de combinação que proporcionam protecção contra uma gama de patogénios diferentes. Um veículo de proteína D é, surpreendentemente, útil como um veículo em vacinas de combinação onde estão conjugados múltiplos antigénios polissacáridos. Como mencionado acima, é provável que ocorra supressão de epitopo se for utilizado o mesmo veículo para cada polissacárido. O documento W098/51339 apresenta composições para tentar minimizar esta interferência por conjugação de uma proporção dos polissacáridos na composição em DT e o resto em TT.

De um modo surpreendente, os presentes requerentes verificaram que a proteína D é, particularmente, adequada para minimizar tais efeitos de supressão de epitopos em vacinas de combinação. Um ou mais polissacáridos numa combinação podem estar, de um modo vantajoso, conjugados à proteína D e, de um

modo preferido, todos os antigénios estão conjugados à proteína D em tais vacinas de combinação.

Uma combinação preferida inclui uma vacina que proporciona protecção contra infecção por *Neisseria meningitidis* C e Y (e, de um modo preferido, A), em que o antigénio polissacárido de um ou mais dos serotipos Y e C (e de um modo muito preferido, A), estão ligados à proteína D.

A vacina baseada em polissacárido de *Haemophilus influenzae* (PRP conjugado com, de um modo preferido, TT, DT ou CRM197 ou, de um modo muito preferido, com a proteína D) pode ser formulada com as vacinas de combinação anteriores.

Muitas vacinas Pediátricas são actualmente administradas como uma vacina de combinação, de modo a reduzir o número de injecções que uma criança tem que receber. Assim, para vacinas Pediátricas, podem ser formulados outros antigénios com as vacinas da invenção. Por exemplo, as vacinas da invenção podem ser formuladas com ou administradas separadamente, mas ao mesmo tempo com a, bem conhecida vacina de combinação "trivalente" que compreende o toxóide da Difteria (DT), toxóide do tétano (TT), e componentes de pertussis [tipicamente, toxóide de Pertussis desintoxicado (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) com pertactina (PRN) e/ou aglutinina 1+2 opcional], por exemplo, a vacina que está no mercado INFANRIX-DTPa<sup>TM</sup> (SmithKlineBeecham Biologicals) que contém os antigénios DT, TT, PT, FHA e PRN ou com um componente de célula inteira de pertussis, por exemplo, como comercializado pela SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como Tritanrix<sup>TM</sup>. A vacina de combinação pode compreender também outro antigénio, tal como o antigénio de superfície da Hepatite B (HBsAg), antigénios do Poliovírus (por exemplo, poliovírus

trivalente inativado-IPV), proteínas da membrana externa de *Moraxella catarrhalis*, proteínas de *Haemophilus influenzae* não-típavel, proteínas da membrana externa de *N. meningitidis B*.

Exemplos de antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* preferidos que podem ser incluídos numa vacina de combinação (especialmente para a prevenção de otite média) são: OMP106 [documentos WO 97/41731 (Antex) & WO96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA & LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA & TbpB [documentos WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et al.(1993) Infect. Immun. 61: 2003-2010]; UspA1/2 [documento WO 93/03761 (Universidade do Texas)] e OmpCD. Exemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* não-típavel que podem ser incluídos numa vacina de combinação (especialmente, para a prevenção de otite média) incluem: proteína Fimbrina [(documento US 5766608 Ohio State Research Foundation)] e fusões compreendendo os seus péptidos [e. g., fusões de péptido, LB1 (f); documento US 5843464 (OSU) ou documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of New York)]; TbpA e TbpB; Hia; Hmw 1,2; Hap; e D15.

As vacinas Pediátricas preferidas contempladas pela invenção são:

- a) conjugado polissacárido de *N. meningitidis C* e conjugado polissacárido de *Haemophilus influenzae b*, opcionalmente, com conjugado polissacárido de *N. meningitidis A* e/ou Y, desde que, todos os polissacáridos estejam conjugados à proteína D.

- b) Vacina a) com, DT, TT, componentes de pertussis (de um modo preferido, PT, FHA e PRN), antigénio de superfície de Hepatite B e IPV (vacina inactivada do poliovírus trivalente).
  
- c) antigénios polissacáridos de *Streptococcus pneumoniae* conjugados a proteína D.
  
- d) Vacina c) com um ou mais antigénios de *Moraxella catarrhalis* e/ou *Haemophilus influenzae* não-tipável.

Todas as vacinas de combinação acima podem beneficiar da inclusão de proteína D como um veículo. Nitidamente, quantos mais veículos estiverem envolvidos numa vacina de combinação (por exemplo, para ultrapassar a supressão do epitopo), mais dispendiosa e complexa fica a vacina final. Possuindo todos ou a maioria dos antigénios polissacáridos de uma vacina de combinação conjugados à proteína D proporciona, assim, uma vantagem considerável.

Para a prevenção de pneumonia na população de idosos (+55 anos) e Otite média em Bebés ou crianças, é uma forma de realização preferida da invenção, combinar antigénios polissacáridos de pneumonia por streptococos multivalente-proteína D, como aqui descrito com uma proteína de *Streptococcus pneumoniae* ou os seus equivalentes imunologicamente funcionais. Ver acima a secção "Proteínas Pneumocócicas da invenção" para combinações de proteínas/proteína preferidas que podem ser incluídas em tal combinação.

Consequentemente, a presente invenção proporciona uma composição imunogénica compreendendo um conjugado de polissacárido de *Streptococcus pneumoniae*-proteína D e um antigénio proteico de *Streptococcus pneumoniae*.

Os antigénios do conjugado polissacárido-proteína D da presente invenção são, de um modo preferido, adjuvados na formulação da vacina da invenção. Os adjuvantes adequados incluem um sal de alumínio, tais como gel de hidróxido de alumínio (alúmem) ou fosfato de alumínio, mas também podem ser um sal de cálcio, ferro ou zinco ou podem ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada ou açúcares acilados, polissacáridos cationicamente ou anionicamente derivatisados ou polifosfazenos.

Para vacinas para idosos é preferido que o adjuvante seja seleccionado para ser um indutor preferido de uma resposta do tipo TH1.

Para adjuvantes Th1 particulares, ver "Adjuvantes TH1 da invenção" acima.

Noutro aspecto da presente invenção é proporcionado um imunogénio ou vacina, como aqui descrito, para utilização em medicina.

Para a preparação/administração da vacina do conjugado, ver "Preparação de Vacinas da Invenção" acima.

A proteína D é também utilizada, de um modo vantajoso, numa vacina contra a otite média, na medida em que ela própria é um imunogénio capaz de produzir protecção mediada por células B

contra *H. influenzae* não-tipável (ntHi). O ntHi pode invadir células hospedeiras e escapar aos efeitos mediados por células B induzidos pelo antigénio proteico. Os presentes requerentes verificaram, de um modo surpreendente, uma maneira de aumentar a eficácia da proteína D (por si própria ou como um veículo para um polissacárido) como um antigénio para uma vacina para otite média. Isto é efectuado ao adjuvar a proteína D de modo a que seja induzida uma forte resposta por Th1 no indivíduo, de modo a que a ramificação do sistema imunitário mediado por células, seja optimizada contra a proteína D. Isto é alcançado, de um modo surpreendente, utilizando uma composição liofilizada compreendendo proteína D e um adjuvante Th1 (de um modo preferido, 3D-MPL) que é reconstituído pouco antes da administração. Assim, a invenção proporciona também tais composições, um processo para preparar tais composições (por liofilização de uma mistura compreendendo proteína D e um adjuvante Th1) e uma utilização de tal composição no tratamento de otite média.

Num sentido mais amplo, os requerentes verificaram que a liofilização de um imunogénio na presença de um adjuvante Th1 (ver "adjuvantes Th1 da invenção"), de um modo preferido, 3D MPL irá, de um modo geral, aumentar a resposta imune contra o imunogénio. A presente invenção é, por isso, aplicável a qualquer imunogénio para o qual é necessária uma resposta imune por Th1 mais forte. Tais imunogénios compreendem antigénios proteicos bacterianos, virais e tumorais, bem como as próprias proteínas e péptidos.

## **EXEMPLOS**

Os exemplos ilustram mas não limitam a invenção.

### **Exemplo 1**

#### ***Polissacárido capsular de S.pneumoniae:***

A vacina 11-valente candidata, inclui os polissacáridos capsulares dos serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F que foram preparados essencialmente como descrito no documento EP72513. Cada polissacárido é activado e derivatizado utilizando química CDAP (documento WO 95/08348) e conjugado ao veículo proteico. Todos os polissacáridos são conjugados na sua forma nativa, excepto para o serotipo 3 (que foi reduzido no tamanho para diminuir a sua viscosidade).

#### ***Veículo proteico:***

O veículo proteico seleccionado é a proteína D recombinante (PD) de *Haemophilus influenzae* Não-tipável, expressa em *E. coli*.

## **EXPRESSÃO DA PROTEÍNA D**

### **Proteína D de *Haemophilus influenzae***

### **Construção genética para a expressão da proteína D**

#### **Materiais de partida**

#### ***O ADN que codifica a Proteína D***

A proteína D é altamente conservada entre *H. influenzae* de todos os serotipos e estirpes não tipáveis. O vector pHIC348 contendo a sequência de AND codificando a sequência de ADN que codifica o gene da proteína D inteiro foi obtido pelo Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmo General Hospital, Malmo, Suécia. A sequência de AND da proteína D foi publicada por Janson *et al.* (1991) *Infect. Immun.* 59: 119-125.

#### ***O vector de expressão pMG1***

O vector de expressão pMG1 é um derivado de pBR322 (Gross *et al.*, 1985) no qual foram introduzidos elementos de controlo derivados de bacteriófago  $\lambda$  para transcrição e tradução de genes estranhos, inseridos (Shatzman *et al.*, 1983). Além disso, o gene de resistência à ampicilina foi trocado com o gene de resistência à canamicina.

### **A estirpe AR58 de *E. coli***

A estirpe AR58 de *E. coli* foi gerada por transdução de N99 com um stock de fago P1 previamente cultivado num derivado SA500 (galE::TN10, lambdaKil<sup>-</sup> cI857 ΔH1).

O N99 e SA500 são estirpes K12 de *E. coli* derivadas do laboratório do Dr. Martin Rosenberg no National Institute of Health.

### **O vector de expressão pMG1**

Para a produção da proteína D, o ADN que codifica a proteína tem sido clonado no vector de expressão pMG1. Este plasmídeo utilize sinais do ADN do fago lambda para orientar a transcrição e tradução dos genes estranhos inseridos. O vector contém o promotor PL, operador OL e dois locais de utilização (NutL e NutR) para aliviar os efeitos de polaridade transcricional quando é proporcionada a proteína N (Gross *et al.*, 1985). Os vectores contendo o promotor PL são introduzidos num hospedeiro lisogénico de *E. coli* para estabilizar o ADN do plasmídeo. As estirpes do hospedeiro lisogénico contém ADN de fago lambda com replicação defeituosa, integrado no seu genoma (Shatzman *et al.*, 1983). O ADN de fago lambda cromossomal direcciona a síntese da proteína repressora cI que se liga ao repressor OL do vector e previne a ligação da ARN polimerase ao promotor PL e, deste modo, a transcrição do gene inserido. O gene cI da estirpe AR58 de expressão contém um mutante sensível à temperatura, de modo a que, a transcrição direccionada pelo PL possa ser regulada por alteração da temperatura, *i. e.*, um aumento na temperatura da cultura inactiva o repressor e é

iniciada a síntese de proteína estranha. Este sistema de expressão permite a síntese controlada de proteínas estranhas, especialmente, aquelas que podem ser tóxicas para a célula (Shimatoka & Rosenberg, 1981).

### ***A estirpe AR58 de E.coli***

A estirpe AR58 lisogénica de *E. coli* utilizada para a produção do veículo proteico D é um derivado da estirpe N99 de *E. coli* K12 de NIH convencional ( $F^- su^- galK2, lacZ^- thr^-$ ). Contém um fago lambda lisogénico defeituoso ( $galE::TN10, lambdaKil^- cI857 \Delta H1$ ). O fenótipo  $Kil^-$  previne a interrupção da síntese macromolecular do hospedeiro. A mutação  $cI857$  confere uma lesão sensível à temperatura ao repressor  $cI$ . A deleção de  $\Delta H1$  remove o operão direito do fago lambda e o *loci*  $bio, uvr3$  e  $chlA$  dos hospedeiros. A estirpe AR58 foi gerada por tradução do N99 com um stock de fago P1, previamente crescido num derivado SA500 ( $galE::TN10, lambdaKil^- cI857 \Delta H1$ ). A introdução do lisogénico defeituoso no N99 foi seleccionada com tetraciclina em virtude da presença de um transposição TN10 codificando para a resistência à tetraciclina no gene  $galE$  adjacente.

### ***Construção do vector pMGMDPPrD***

Foi utilizado o vector pMG 1 que contém o gene que codifica para a proteína S1 não estrutural do vírus Influenza (pMGNSI) para construir o pMGMDPPrD. O gene da proteína D foi amplificado por PCR a partir do vector pHIC348 (Janson *et al.* 1991) com iniciadores de PCR contendo os locais de restrição NcoI e XbaI nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O fragmento NcoI/XbaI

foi depois introduzido no pMGNS1, entre o NcoI e o XbaI, criando assim uma proteína de fusão contendo 81 aminoácidos do N-terminal da proteína NS1, seguida pela proteína PD. Este vector foi denominado pMGNS1PrD.

Com base na construção descrita acima, foi criada a construção final para a expressão da proteína D. Foi removido um fragmento BamHI/BamHI de pMGNS1PrD. Esta hidrólise de ADN remove a região que codifica o NS1, excepto os primeiros três resíduos do N-terminal. Após nova ligação do vector, foi formado um gene que codifica para uma proteína de fusão com a seguinte sequência de aminoácidos N-terminal:

```
-----MDP SSHSSNMANT-----  
NS1                Proteína D
```

A proteína D não contém um péptido líder ou a cisteína N-terminal, ao qual as cadeias lipídicas estão normalmente ligadas. Deste modo, a proteína não é excretada para o periplasma nem deslipidada e permanece no citoplasma numa forma solúvel.

A construção final de pMG-MDPPrD foi introduzida na estirpe hospedeira AR58 por choque térmico aquecimento a 37° C. As bactérias contendo o plasmídeo foram seleccionadas na presença de canamicina. A presença do pedaço de ADN que codifica a proteína D foi demonstrada por digestão do ADN plasmídico isolado com endonucleases seleccionadas. A estirpe de *E. coli* recombinante é referida como ECD4.

A expressão da proteína D está sob controlo do promotor  $P_L$ /Operador  $O_L$  lambda. A estirpe hospedeira AR58 contém no genoma um gene cI sensível à temperatura que bloqueia a expressão do  $P_L$  lambda a temperatura baixa, por ligação ao  $O_L$ . Quando a temperatura é elevada, o cI é libertado de  $O_L$  e a proteína D é expressa. No final da fermentação, as células são concentradas e congeladas.

A extracção de células recolhidas e a purificação da proteína D foi efectuada como se segue. O sedimento da cultura celular congelada é descongelado e ressuspenso numa solução de disrupção celular (Tampão citrato pH 6,0) para uma  $OD_{650}$  final = 60. A suspensão é passada duas vezes através de um homogeneizador de elevada pressão a  $P = 1000$  bar. O homogenato da cultura celular é clarificado por centrifugação e os detritos celulares são removidos por filtração. No primeiro passo de purificação, o lisado filtrado é aplicado numa coluna de cromatografia de permuta catiónica (SP Sepharose Fast Flow<sup>TM</sup>). A PD liga-se à matriz do gel por interacções iónicas e é eluída por um aumento gradual da força iónica do tampão de eluição.

Num segundo passo de purificação, as impurezas ficam retidas numa matriz de permuta aniónica (Q Sepharose Fast Flow<sup>TM</sup>). A PD não se liga ao gel e pode ser recolhida durante o fluxo.

Em ambos os passos de cromatografia em coluna, recolha das fracções é monitorizada por OD. O fluxo através da coluna de cromatografia de permuta aniónica contendo a proteína D é concentrado por ultracentrifugação.

O retido por ultracentrifugação contendo a proteína D é finalmente passado através de uma membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ .

***Química:***

***Química de activação e ligação:***

As condições de activação e ligação são específicas para cada polissacárido. Estas são apresentadas na Tabela 1. O polissacárido nativo (excepto para PS3) foi dissolvido em NaCl 2 M ou em água para injeção. A concentração óptima de polissacárido foi avaliada para todos os serotipos.

A partir de uma solução stock de 100 mg/mL em acetonitrilo, foi adicionado CDAP (proporção CDAP/PS de 0,75 mg/mg de PS) à solução de polissacárido. 1,5 minutos depois, foi adicionada trietilamina 0,2 M para obter o pH de activação específica. A activação do polissacárido foi efectuada a este pH durante 2 minutos a 25° C. Foi adicionada a proteína D (a quantidade depende da proporção PS/PD inicial) ao polissacárido activado e a reacção de ligação foi efectuada ao pH específico durante 1 hora. A reacção foi depois terminada com glicina durante 30 minutos a 25° C e de um dia para o outro a 4° C.

Os conjugados foram purificados por filtração em gel, utilizando uma coluna de filtração em gel em Sephacryl<sup>TM</sup> 500HR equilibrada com NaCl 0,2 M.

Foi determinado o conteúdo em hidrato de carbono e proteína das fracções eluídas. Os conjugados foram reunidos e esterilizados por filtração numa membrana de esterilização de

0,22  $\mu\text{m}$ . Foram determinadas as proporções PS/Proteína nas preparações de conjugados.

### **Caracterização:**

Cada conjugado foi caracterizado e reuniu as especificações descritas na Tabela 2. O conteúdo em polissacárido ( $\mu\text{g/mL}$ ) foi determinado através do teste de Resorcinol e o conteúdo em proteína ( $\mu\text{g/mL}$ ) através do teste de Lowry. A proporção PS/PD final (p/p) é determinado através da proporção das concentrações.

### **Conteúdo Residual em DMAP ( $\text{ng}/\mu\text{g}$ de PS):**

A activação do polissacárido com CDAP introduz um grupo cianeto no polissacárido e o DMAP (4-dimetilamino-piridina) é libertado. O conteúdo residual em DMAP foi determinado através de um ensaio específico desenvolvido no SB.

### **Conteúdo em polissacárido livre (%):**

O conteúdo em polissacárido livre dos conjugados mantidos a 4 °C ou armazenados 7 dias a 37 °C foi determinado no sobrenadante obtido após incubação com anticorpos  $\alpha$ -PD e sulfato de amónio saturado, seguido por uma centrifugação.

Foi utilizado um ELISA para a quantificação do polissacárido livre no sobrenadante. A ausência de conjugado foi também controlada por um ELISA  $\alpha$ -PD/ $\alpha$ -PS. A redução na

quantidade de polissacárido livre resulta numa vacina conjugada melhorada.

#### **Antigenicidade:**

Foi analisada a antigenicidade nos mesmos conjugados num ELISA do tipo sandwich, em que a captura e detecção dos anticorpos foram  $\alpha$ -PS e  $\alpha$ -PD, respectivamente.

#### **Conteúdo em proteína livre (%):**

O nível em proteína D residual "livre" foi determinado utilizando um método com tratamento com SDS da amostra. O conjugado foi aquecido 10 min a 100 °C na presença de SDS a 0,1% e injectado numa coluna de filtração em gel SEC-HPLC (TSK3000-PWXL). Como a proteína D é um dímero, existe um risco de sobrevalorizar o nível de proteína D "livre" por dissociação da estrutura com SDS.

#### **Tamanho molecular ( $K_{av}$ ):**

O tamanho molecular foi determinado numa coluna de filtração em gel SEC-HPLC (TSK 5000-PWXL).

### **Estabilidade:**

Foi determinada a estabilidade para conjugados mantidos a 4 °C e armazenados durante 7 dias a 37 °C, em coluna de filtração em gel HPLC-SEC (TSK6000-PWXL).

A caracterização da 11-valente é apresentada na Tabela 2. Os conjugados proteicos podem ser adsorvidos em fosfato de alumínio e reunidos para formar a vacina final.

### **Conclusão:**

Foram produzidos conjugados imunogénicos que desde então demonstraram ser componentes de uma vacina promissora. Foram descobertas as condições CDAP optimizadas para o produto polissacárido pneumocócico conjugado final de melhor qualidade para cada uma das 11 valências. Os conjugados destes polissacáridos pneumocócicos obtidos pelo processo CDAP melhorado (optimizado) acima (independentemente do veículo proteico mas, de um modo preferido, a proteína D) é, assim, outro aspecto da invenção.

### **Exemplo 2 - Estudo do Efeito de Adjuvantes Desenvolvidos na Imunogenicidade da Vacina Conjugada PS-PD Pneumocócica 11-Valente em Ratos Bebés**

Os ratos bebés foram imunizados com vacina conjugada PS-PD pneumocócica 11-valente a uma dosagem de 0,1 µg de cada polissacárido (preparada de acordo com o método do Exemplo 1) e

utilizando as seguintes formulações adjuvantes: nenhuma,  $\text{AlPO}_4$ , 3D-MPL, 3D-MPL em  $\text{AlPO}_4$ .

A formulação apenas com 3D-MPL foi estatisticamente (e surpreendentemente) mais imunogénica (IgG GMC mais elevado) que para outras formulações para 5 de 11 antigénios. Isto foi verdade a concentrações elevadas e baixas de 3D-MPL.

A fagocitose por opsonização confirmou os resultados de GMC.

## **Materiais e Métodos**

### *Protocolo de Imunização*

Os ratos bebés OFA foram escolhidos ao acaso de diferentes progenitoras e tinham 7 dias de idade quando receberam a primeira imunização. Receberam 2 imunizações adicionais, 14 e 28 dias depois. Foi efectuada uma recolha de sangue no dia 56 (28 dias após III). Todas as vacinas foram injectadas s.c. e existiam 10 ratos por grupo de vacina.

Os ratos foram imunizados com uma vacina conjugada pneumocócica 11 valente compreendendo os seguintes serotipos de polissacáridos conjugados a proteína D: 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F.

### *Formulação*

Para examinar o efeito dos diferentes adjuvantes avançada, foi mantida constante a dosagem de conjugado a 0,1  $\mu\text{g}$  de cada

polissacárido e os adjuvantes  $\text{AlPO}_4$  e 3D-MPL foram formulados a diferentes dosagens e combinações, incluindo sem adjuvante. Estes estão listados numericamente na Tabela 3 para referência.

#### *Adsorção em $\text{AlPO}_4$*

Os monovalentes adsorvidos concentrados foram preparados de acordo com o seguinte processo. Foram misturadas 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{AlPO}_4$  (pH 5,1) com 5  $\mu\text{g}$  de polissacáridos conjugados, durante 2 horas. O pH foi ajustado para pH 5,1 e a mistura foi deixada durante mais 16 horas. Foi adicionado NaCl 1500 mM para tornar a concentração salina 150 mM. Após 5 minutos, foi adicionado 2-fenoxietanol a 5 mg/mL. Após mais 30 minutos, o pH foi ajustado para 6,1 e deixado durante mais de 3 dias a 4 °C.

#### *Preparação dos diluentes*

Foram preparados três diluentes em NaCl 150 mM/fenoxietanol 5 mg/mL

A:  $\text{AlPO}_4$  a 1 mg/mL.

B: 3D-MPL em  $\text{AlPO}_4$  a 250 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente  
Proporção em peso 3D-MPL/ $\text{AlPO}_4$  = 5/20

C: 3D-MPL em  $\text{AlPO}_4$  a 561 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente  
Proporção em peso 3D-MPL/ $\text{AlPO}_4$ =50/89

### *Preparação de undecavalente adsorvido*

Os onze monovalentes PS-PD adsorvidos concentrados foram misturados na proporção correcta. Foi adicionado o complemento de  $\text{AlPO}_4$  como o diluente A. Quando necessário, foi adicionado 3D-MPL como uma solução aquosa (não adsorvida, Método 1, ver abaixo) ou como o diluente B ou C (3D-MPL adsorvido em  $\text{AlPO}_4$  a 2 doses, Método 2, ver abaixo).

#### *Método 1*

Foi adicionado 3D-MPL aos conjugados adsorvidos combinados como uma suspensão aquosa. Foi misturada ao undecavalente durante 10 minutos à temperatura ambiente e armazenado a 4 °C até administração.

#### *Método 2*

O 3D-MPL foi pré-adsorvido a  $\text{AlPO}_4$  antes da adição aos conjugados adsorvidos combinados (diluente B e C). Para preparar 1 mL de diluente, foi misturada uma suspensão aquosa de 3D-MPL (250 ou 561  $\mu\text{g}$ ) com 1 mg de  $\text{AlPO}_4$  em NaCl 150 mM pH 6,3, durante 5 min à temperatura ambiente. Esta solução foi diluída em NaCl a pH 6,1/fenoxilo e incubada de um dia para o outro a 4 °C.

### *Preparação do undecavalente não adsorvido*

Os onze conjugados PS-PD foram misturados e diluídos na proporção correcta em NaCl 150 mM pH 6,1, fenoxilo. Quando

necessário, foi adicionado 3D-MPL como uma solução (não adsorvido).

As formulações para todas as injeções foram preparadas 18 dias antes da primeira administração.

### *ELISA*

O ELISA foi efectuado para determinar a IgG no rato utilizando o protocolo derivado de WHO Workshop em processo de ELISA para a quantificação de anticorpo IgG contra polissacáridos da cápsula de *Streptococcus pneumoniae* no soro humano. Em resumo, o polissacárido capsular purificado é revestido directamente na placa de microtitulação. As amostras de soro são pré-incubadas com o polissacárido da parede celular comum a todos os pneumocócus (substância C) e que está presente em ca. 0,5% em polissacáridos pneumocócicos purificados de acordo com a divulgação (documento EP72513 B1). Os reagentes de Jackson ImmunoLaboratories Inc. foram empregues para detectar as IgG de murinos ligadas. As curvas de titulação foram referenciadas a padrões internos (anticorpos monoclonais) modelados pela equação log logística. Os cálculos foram efectuados utilizando o software SoftMax Pro. Espera-se que o erro máximo sublinhado nestes resultados esteja dentro de um factor de 2. O erro relativo é inferior a 30%.

### *Fagocitose por Opsonização*

Foram determinados os títulos de opsonização para os serotipos 3, 6B, 7F, 14, 19F e 23F, utilizando o protocolo CDC

(Fagocitose por opsonização de *Streptococcus pneumoniae* utilizando células HL60 Diferenciadas, versão 1.1) com PMN humanos purificados e complemento de coelho bebê. A modificação inclui a utilização de estirpes pneumocócicas internas e as células HL60 fagocíticas foram substituídas por neutrófilos PMN humanos purificados (existe um elevado grau de correlação entre estas células fagocíticas). Além disso, foram adicionadas esferas de vidro de 3 mm aos poços de microtitulação para aumentar a mistura e isto permitiu a redução da proporção fagócito:bactérias, que foi recomendada ser de 400.

## **Resultados**

### *Concentrações em IgG*

As concentrações médias geométricas e IgG determinadas para cada serotipo e PD são apresentadas nas Tabelas 4 a 10. Para os serotipos 6B, 14, 19F e 23F, estão incluídos os resultados obtidos previamente utilizando uma formulação tetravalente, para comparação.

As concentrações de IgG mais elevadas foram realçadas nas Tabelas 4 a 10. O valor p estatístico para as composições de 3D-MPL vs. composições de 3D-MPL/AlPO<sub>4</sub>, encontra-se na Tabela 11. A formulação de adjuvante número 4 (conjugados não adsorvidos com dose elevada de 3D-MPL) que proporciona as GMC superiores para 9 dos 11 casos. Em 5/11 casos, o MPL a dose mais baixa é o segundo mais imunogénico. Além disso, a adjuvação proporciona a GMC mais elevada relativamente à modificação de dose para todos os serotipos (dados não apresentados) e isto é estatisticamente

significativo para os serotipos 4, 6B, 7F, 18C e 23F ( $p < 0,05$  com 95% CI).

#### *Fagocitose por opsonização*

A fagocitose por opsonização no soro reunido para os serotipos 3, 6B, 7F, 14, 19F e 23F é apresentada nas Tabelas 4 a 8. Para a maioria, estes títulos de opsonização confirmam a IgG de GMC. De facto, a correlação com a concentração de IgG é superior a 85% para os serotipos 6B, 19F, 23F (dados não apresentados). Para o serotipo 3, é importante notar que apenas o grupo 3D-MPL induziu actividade de opsonização acima do limite.

#### **Conclusões**

Nesta experiência, não era esperado que a utilização de 3D-MPL isolado induzisse as concentrações de IgG mais elevadas.

A IgG de GMC máxima obtida por modificação do adjuvante foi comparada com a GMC máxima obtida por modificação da dosagem em PS e verificou-se que o 3D-MPL poderá induzir respostas, significativamente, superiores em 5/11 serotipos.

A Tabela 11 mostra que quando as composições 3D-MPL e 3D-MPL/AlPO<sub>4</sub> são comparadas (comparando o processo de formulação e a dose de 3D-MPL), 5 dos conjugados polissacáridos são, significativamente, melhores em termos de imunogenicidade, quando formulados apenas com 3D-MPL em vez de 3D-MPL mais AlPO<sub>4</sub>:PS 4, PS 6B, PS18C, PS 19F e PS 23F.

**Exemplo 3-Estudo do efeito da combinação na imunogenicidade dos conjugados PS 4, PS 6B, PS 18C, PS 19F e PS 23F em ratos adultos**

Os ratos adultos foram imunizados com vacinas conjugadas de polissacárido pneumocócico-proteína D quer individualmente ou combinadas numa composição multivalente (quer tetra-, penta-, hepta- ou undecavalente). Grupos de 10 ratos foram imunizados duas vezes, com intervalo de 28 dias e recolhas de sangue de teste foram obtidas no dia 28 e dia 42 (14 dias depois da 2ª dose).

O soro foi testado por ELISA para anticorpos IgG para os polissacáridos pneumocócicos. Todos os conjugados induziram anticorpos IgG específicos, como determinado por ELISA. A Tabela 12 mostra o efeito da combinação de conjugados de proteína D com PS 6B, PS 18C, PS 19F e PS 23F monovalente na sua imunogenicidade em ratos adultos, como determinado pela concentração IgG no dia 14 após a 2ª dose.

A análise estatística foi efectuada para todas as amostras para determinar se as diferenças na concentração de anticorpo, após combinação, foram significativas. A combinação de qualquer um dos conjugados de proteína D com serotipos PS 6B, PS 18C, PS 19F e PS 23F numa vacina multivalente, não alteraram significativamente, a sua imunogenicidade.

**Tabela 1****Condições de activação específica/ligação/inactivação de conjugados PS de *S.pneumoniae*-Proteína D**

Serotipo	1	3 ( $\mu$ fluid.)	4	5	6B	7F
Conc. de PS (mg/mL)	2,0	3,0	2,0	7,5	5,4	3,0
Dissolução de PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. de PD (mg/mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proporção inicial PS/PD (p/p)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0

Serotipo	9V	14	18C	19F	23F
Conc. de pS (mg/mL)	2,5	2,5	2,0	4,0	3,3
Dissolução de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	H <sub>2</sub> O	NaCl 2M	NaCl 2M
Conc. de PD (mg/mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proporção PS/PD inicial (p/p)	1/0,75	1/075	1/1	1/0,5	1/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	10/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0

TABELA 2: Especificações da vacina PS-PD pneumocócica 11-valente (os primeiros números do código do lote indicam o serotipo)

<b>Critério</b>	<b>D01PDJ227</b>	<b>D03PDJ236</b>	<b>D4PDJ228</b>	<b>D5PDJ235</b>	<b>D6PDJ09</b>	
<b>Proporção PS/Prot (p/p)</b>	1/0,66	1/1,09	1/0,86	1/0,86	1/0,69	
<b>Conteúdo em Polis.livre (%) &lt;10%</b>	1	1	7	9	0	
<b>Conteúdo em proteína livre (%) &lt;15%</b>	8	<1	19	21	9	
<b>Conteúdo em DMAP (ng/μg de PS) &lt;0,5 ng/μg de PS</b>	0,2	0,6	0,4	1,2	0,3	
<b>Tamanho molecular (K<sub>av</sub>)</b>	0,18	0,13	0,12	0,11	0,13	
<b>Estabilidade</b>	sem alteração	sem alteração	sem alteração	pouca alteração	sem alteração	
	<b>D07PDJ225</b>	<b>D09PDJ222</b>	<b>D14PDJ202</b>	<b>D18PDJ221</b>	<b>D19PDJ206</b>	<b>D23PDJ212</b>
<b>Proporção PS/Prot (p/p)</b>	1/0,58	1/0,80	1/0,68	1/0,62	1/0,45	1/0,74
<b>Conteúdo em Polis.livre (%) &lt;10%</b>	1	<1	<1	4	4	0
<b>Conteúdo em proteína livre (%) &lt;15%</b>	8	0,3	3	21	10	12
<b>Conteúdo em DMAP (ng/μg de PS) &lt;0,5 ng/μg de PS</b>	0,1	0,6	0,3	0,2	0,1	0,9
<b>Tamanho molecular (K<sub>av</sub>)</b>	0,14	0,14	0,17	0,10	0,12	0,12
<b>Estabilidade</b>	Sem alteração					

Tabela 3. Tabela Resumo das Formulações de Adjuvante testadas com PS-PD Pneumocócico 11-Valente em Ratos Bebés

Grupo	AlPO4	MPL	Método	Descrição
1				Nenhum
2	100			AlPO4
3		5		MPL baixo
4		50		MPL Elevado
5	100	5	Método 1	Método 1 baixo
6	100	50	Método 1	Método 1 elevado
7	100	5	Método 2	Método 2 baixo
8	100	50	Método 2	Método 2 elevado

Tabela 4. Concentração Média Geométrica de IgG do Serotipo 6B, Seroconversão e Título de Opsonização Medido ao Dia 28 Após Imunização III dos Ratos Bebés com PS-PD 11-valente utilizando Adjuvantes Diferentes (e Comparação com Imunização Tetravalente)

Grupo	AlPO4 µg	MPL µg	Método	GMC de IgG de 6B (µg/mL)	Sero- conver- são de 6B	Título* de Opso de 6B	GMC de IgG de 6B (µg/mL)	Sero- conver- são de 6B	Título* de Opso de 6B
				Tetravalente			Undecavalente		
1				0,047	2/10	12,5	0,004	1/10	<6,25
2	100			0,048	4/10	65	0,019	4/10	<6,25
3		5					1,345	10/10	43
<b>4</b>		<b>50</b>					<b>4,927</b>	<b>10/10</b>	<b>192</b>
5	100	5	1				0,042	7/10	<6,25
6	100	50	1				0,255	10/10	<6,25
7	100	5	2	0,033	3/10	<6,25	0,048	8/10	<6,25
8	100	50	2				0,057	8/10	<6,25

Tabela 5. Concentração Média Geométrica de IgG do Serotipo 14, Seroconversão e Título de Opsonização Médio ao Dia 28 Após Imunização III dos Ratos Bebés com PS-PD 11-valente utilizando Adjuvantes Diferentes (e Comparação com Imunização Tetravalente)

Grupo	AlPO4	MPL	Método	GMC de IgG de 14 (µg/mL)	Sero-conversão de 14	Título* de Opso de 14	GMC de IgG de 14 (µg/mL)	Sero-conversão de 14	Título* de Opso de 14
				Tetravalente			Undecavalente		
1				0,046	3/10	64	0,022	3/10	<6,25
2	100			0,99	10/10	88	0,237	8/10	27
3		5					0,233	10/10	41
4		50					0,676	10/10	81
5	100	5	1				0,460	9/10	67
6	100	50	1				0,477	10/10	98
7	100	5	2	0,81	10/10	49	0,165	8/10	81
<b>8</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>2</b>				<b>1,611</b>	<b>10/10</b>	<b>133</b>

Tabela 6. Concentração Média Geométrica de IgG do Serotipo 19F, Seroconversão e Título de Opsonização Médio ao Dia 28 Após Imunização III dos Ratos Bebés com PS-PD 11-valente utilizando Adjuvantes Diferentes (e Comparação com Imunização Tetravalente)

Grupo	AlPO4 µg	MPL µg	Método	GMC de IgG de 19F (µg/mL)	Sero-conversão de 19F	Título* de Opso de 19F	GMC de IgG de 19F (µg/mL)	Sero-conversão de 19F	Título* de Opso de 19F
				Tetravalente			Undecavalente		
1				0,04	2/10	64	0,021	2/10	<6,25
2	100			1,07	9/10	367	0,222	7/10	79
3		5					4,028	10/10	296
<b>4</b>		<b>50</b>					<b>21,411</b>	<b>10/10</b>	<b>1276</b>
5	100	5	1				1,649	10/10	172
6	100	50	1				2,818	10/10	208
7	100	5	2	1,09	10/10	193	0,766	10/10	323
8	100	50	2				3,539	10/10	241

Tabela 7. Concentração Média Geométrica de IgG do Serotipo 23F, Seroconversão e Título de Opsonização Médio ao Dia 28 Após Imunização III dos Ratos Bebês com PS-PD 11-valente utilizando Adjuvantes Diferentes (E Comparação com Imunização Tetravalente)

Grupo	AlPO4 µg	MPL µg	Método	GMC de IgG de 23F (µg/mL)	Sero- conver- são de 23F	Título* de Opso de 23F	GMC de IgG de 23F (µg/mL)	Sero- conver- são de 23F	Título* de Opso de 23F
				Tetravalente			undecavalente		
1				0,06	2/10	<6,25	0,152	3/10	<6,25
2	100			0,29	10/10	70	0,56	8/10	<6,25
<b>3</b>		<b>5</b>					<b>2,296</b>	<b>9/10</b>	<b>389</b>
<b>4</b>		<b>50</b>					<b>4,969</b>	<b>10/10</b>	<b>&gt;1600</b>
5	100	5	1				0,462	5/10	17
6	100	50	1				0,635	8/10	54
7	100	5	2	0,38	10/10	<6,25	0,203	3/10	18
8	100	50	2				0,501	7/10	43

Tabela 8. Concentração Média Geométrica de IgG dos Serotipos 3 e 7F, Seroconversão e Título de Opsonização Médio ao Dia 28 Após Imunização III dos Ratos Bebês com PS-PD 11-valente utilizando Adjuvantes Diferentes

Grupo	AlPO4 µg	MPL µg	Método	GMC de IgG de 3 (µg/mL)	Sero- conver- são de 3	Título* de Opso de 3	GMC de IgG de 7F (µg/mL)	Sero- conver- são de 7F	Título* de Opso de 7F
1				0,003	1/10	<6,25	0,040	7/10	<6,25
2	100			0,008	6/10	<6,25	0,25	9/10	43
<b>3</b>		<b>5</b>		<b>0,070</b>	<b>10/10</b>	<b>&lt;6,25</b>	<b>2,435</b>	<b>10/10</b>	<b>477</b>
<b>4</b>		<b>50</b>		<b>0,108</b>	<b>10/10</b>	<b>18</b>	<b>2,569</b>	<b>10/10</b>	<b>332</b>
5	100	5	1	0,015	10/10	<6,25	0,579	10/10	54
6	100	50	1	0,027	10/10	<6,25	0,611	9/10	59
7	100	5	2	0,006	10/10	<6,25	0,154	8/10	30
8	100	50	2	0,034	10/10	<6,25	0,638	9/10	140

Tabela 9. Concentração Média Geométrica de IgG dos Serotipos 1, 4 e 5 e Seroconversão ao Dia 28 Após Imunização III de Ratos Bebés com PS-PD 11-Valente utilizando Diferentes Adjuvantes

Grupo	AlPO4 µg	MPL µg	Método	GMC de IgG de 1 (µg/mL)	Sero- conver- são de 1	GMC de IgG de 4 (µg/mL)	Sero- conver- são de 4	GMC de IgG de 5 (µg/mL)	Sero- conver- são de 5
1				0,026	4/10	0,005	0/10	0,040	3/10
2	100			0,282	8/10	0,052	5/10	0,774	9/10
3		5		1,614	10/10	<b>3,452</b>	<b>10/10</b>	7,927	10/10
<b>4</b>		<b>50</b>		2,261	10/10	<b>7,102</b>	<b>10/10</b>	<b>13,974</b>	<b>10/10</b>
5	100	5	1	0,568	10/10	0,676	10/10	3,015	10/10
6	100	50	1	1,430	10/10	0,419	9/10	5,755	10/10
7	100	5	2	0,478	10/10	0,267	9/10	2,062	10/10
8	100	50	2	1,458	10/10	0,423	10/10	5,009	10/10

Tabela 10. Concentração Média Geométrica de IgG dos Serotipos 9V, 18C e PD e Seroconversão ao Dia 28 Após Imunização III de Ratos Bebés com PS-PD 11-Valente utilizando Diferentes Adjuvantes

Grupo	AlPO4 µg	MPL µg	Método	GMC de IgG de 9V (µg/mL)	Sero- conver- são de 9V	GMC de IgG de 18C (µg/mL)	Sero- conver- são de 18C	GMC de IgG de PD (µg/mL)	Sero- conver- são de PD
1				0,018	0/10	0,013	1/10	0,003	0/10
2	100			0,489	6/10	0,092	5/10	0,993	10/10
3		5		0,482	7/10	<b>6,560</b>	<b>10/10</b>	3,349	10/10
<b>4</b>		<b>50</b>		<b>11,421</b>	<b>10/10</b>	<b>14,023</b>	10/10	5,446	10/10
5	100	5	1	2,133	9/10	0,690	10/10	<b>11,407</b>	10/10
6	100	50	1	2,558	10/10	1,771	10/10	1,258	10/10
7	100	5	2	1,536	10/10	0,528	10/10	1,665	8/10
8	100	50	2	2,448	9/10	0,980	10/10	5,665	10/10

Tabela 11: A significância estatística (valor de p) para determinar se determinados conjugados polissacáridos penumocócicos melhoraram a imunogenicidade quando formulados com 3D-MPL isolado *versus* com 3D-MPL/AlPO<sub>4</sub>. Um valor de p abaixo de 0,01 é considerado altamente significativo. O Método 1 e Método 2 indicam o método de formulação.

Serotipo	50 µg de 3D-MPL vs 3D-MPL/AlPO <sub>4</sub>		5 µg de 3D-MPL vs 3D-MPL/AlPO <sub>4</sub>	
	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
1	0,3	0,05	0,079	0,11
3	0,075	0,01	0,27	0,008
4	0,002	0,0003	0,02	0,003
5	0,04	0,002	0,1	0,12
6B	0,001	0,0001	0,001	0,0006
7F	0,13	0,15	0,01	0,005
9V	0,02	0,02	0,1	0,04
14	0,65	0,21	0,3	0,66
18C	0,0008	0,0002	0,006	0,004
19F	0,0009	0,006	0,21	0,04
23F	0,002	0,0004	0,01	0,0004

Tabela 12: Concentração Média Geométrica de IgG ( $\mu\text{g/mL}$ ) no dia 14 após a 2ª dose após imunização de ratos adultos com 1,0  $\mu\text{g}$  de conjugado polissacárido-proteína D isolado ou combinado em vacina tetravalente, pentavalente, heptavalente ou decavalente. Estes dados são combinados a partir de 5 experiências separadas.

Serotipos	4	6	18C	19F	23F
Vacinas	H	BT	H	T	T
Isolado	9,3	0,11	15	5,2	2,5
Combinado	4	0,23	3,7	3,7	2,8

T: combinado em vacinas de combinação tetravalentes (T) (PS 6B, 14, 19F, 23F), pentavalente (T mais PS 3), heptavalente (H) (T mais PS 4, 9V e 18C) e decavalente (H mais PS 1, 5 e 7F). H: combinado em vacinas de combinação heptavalentes (H) (T mais PS 4, 9V e 18C) e decavalente (H mais PS 1, 5 e 7F).

**Exemplo 4-Impacto benéfico da adição de pneumolisina e 3D-MPL na eficácia protectora de vacina de polissacárido 11-valente conjugado a PD contra colonização pneumocócica do pulmão em murganhos**

#### ***Determinação Imunológica***

*Dosagem por ELISA de IgG no soro específico para pneumolisina*

As imunoplasmas Nunc Maxisorp™ foram revestidas durante 2 horas a 37 °C com 100  $\mu\text{L}$ /poço de pneumolisina nativa recombinante (PLY) a 2  $\mu\text{g/mL}$  diluída em PBS. As placas foram

lavadas 3 vezes com tampão NaCl a 0,9%, Tween-20 a 0,05%. Depois, foram adicionadas diluições de 2 vezes em série (em PBS/Tween-20™ a 0,05%, 100 µL por poço) de um soro anti-PLY de referência, como uma curva padrão (começando a 670 ng/mL de IgG) e as amostras de soro (começando numa diluição 1/10) foram incubadas durante 30 minutos a 20 °C sob agitação. Após lavagem como previamente descrito, a IgG de cabra anti-murganho conjugada a peroxidase (Jackson) diluída 5000x em PBS/Tween-20 a 0,05% foi incubada (100 µL/poço) durante 30 minutos a 20 °C sob agitação. Após lavagem, as placas foram incubadas durante 15 min à temperatura ambiente com 100 µL/poço de tampão de divulgação (OPDA a 0,4 mg/mL e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,05% em tampão citrato 100 mM, pH 4,5). A divulgação foi terminada por adição de 50 µL/poço de HCl 1 N. As densidades ópticas foram lidas a 490 e 620 nm utilizando um imunoleitor Emax (Molecular Devices). Os títulos de anticorpo foram calculados através do método matemático de 4 parâmetros utilizando software SoftMaxPro.

#### *Inibição da Hemólise*

Este ensaio foi efectuado para determinar a capacidade dos anticorpos do soro para inibir a actividade hemolítica da pneumolisina (PLY). De modo a eliminar o colesterol (susceptível de interacção com a PLY), as amostras de soro foram tratadas 2x como se segue: foram misturadas com 1 volume igual de clorofórmio e depois incubadas durante 45 minutos sob agitação. Os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação durante 10 minutos a 1000 rpm. O soro livre de colesterol foi diluído (diluições de 2 vezes em série em ditiotreitol 1 mM, BSA a 0,01%, TRIS 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) em microplacas de 96 poços (Nunc). Foram adicionados cinquenta µL de uma solução

contendo 4 HU (Unidade de Hemólise) de PLY, a cada poço e incubados durante 15 minutos a 37 °C. Depois, foram adicionados 100 µL de células de sangue de ovelha (solução a 1%) durante 30 minutos a 37 °C. Após centrifugação durante 10 minutos a 1000 rpm, os sobrenadantes (150 µL) foram recolhidos e colocados noutra microplaca de 96 poços para leitura da densidade óptica a 405 nm. Os resultados foram expressos como títulos de diluição de ponto médio.

### ***Desintoxicação química da pneumolisina***

A pneumolisina nativa recombinante (PLY) foi dialisada contra tampão Fosfato 50 mM, NaCl 500 mM pH 7,6. Todos os passos seguintes foram efectuados a 39,5 °C sob agitação ocasional. No dia 1, foram adicionados Tween-80 a 10% (1/250 v/v), triptofano de N-acetilo 57,4 mM pH 7,6 (3/100 v/v), glicina 2,2 M em tampão Fosfato (1/100 v/v) e formaldeído a 10% em tampão Fosfato (3/100 v/v) à solução de PLY. Ao dia 2 e 3, foi adicionado de novo formaldeído a 10%, numa proporção 3/100 e 2/100 v/v, respectivamente. A incubação a 39,5 °C foi mantida até ao dia 7 sob agitação ocasional. Finalmente, a PLY foi dialisada contra tampão Fosfato 50 mM, NaCl 500 mM, pH 7,6. A inactivação completa da PLY foi demonstrada no ensaio de hemólise.

### ***Estímulo intranasal pneumocócico em murganhos OF1***

Os murganhos fêmea OF1 com sete semanas de idade foram inoculados intranasalmente sob anestesia com  $5,10^5$  CFU de serotipo 6B de *S. pneumoniae* adaptado para murganho. Os pulmões foram removidos às 6 horas após estímulo e homogeneizados

(Ultramax, 2400 rpm, 4 °C) em meio Todd Hewith Broth (THB, Gibco). Foram plaqueadas diluições de 10 vezes em série, de um dia para o outro a 37 °C, em placas de Petri contendo agar THB suplementado com extracto de levedura. A infecção pneumocócica nos pulmões foi determinada como o número de CFU/murganho, expressa como média ponderada logarítmica. O limite de detecção foi de 2,14 log CFU/murganho.

**Exemplo 4A** - *Efeito do adjuvante 3D-MPL na resposta imune anti-pneumolisina*

No presente exemplo, foi avaliado o impacto do efeito do adjuvante 3D-MPL na resposta imune a pneumolisina recombinante nativa (PLY, proporcionada por J. Paton, Children's Hospital, North Adelaide, Austrália) e o seu correspondente de quimicamente desintoxicado (DPLY). A desintoxicação química foi efectuada como descrito acima.

Grupos de 10 murganhos Balb/c fêmea com 6 semanas de idade foram imunizados intramuscularmente aos dias 0, 14 e 21 com 1 µg de PLY ou DPLY contida em A: 100 µg de AlPO<sub>4</sub>; ou B: 100 µg de AlPO<sub>4</sub> + 5 µg de 3D-MPL (lípidio A de monofosforilo 3-des-O-acilado, fornecido por Ribi Immunochem.) As figuras 1A e 1B mostram os títulos de IgG por ELISA e Inibição da Hemólise (HLI) determinados no soro após-III.

Qualquer que seja o antigénio, as melhores respostas imunes foram induzidas em animais vacinados com formulações suplementadas com 3D-MPL. De um modo interessante, a DPLY foi tão imunogénica como a PLY quando administrada com AlPO<sub>4</sub>+3D-MPL, embora sendo um imunogénio mais fraco em

formulações de AlPO<sub>4</sub>. Isto mostrou a capacidade vantajosa do 3D-MPL para melhorar a resposta do anticorpo à pneumolisina desintoxicada.

Em composições contendo pneumolisina, pode ser preferível utilizar pneumolisina quimicamente desintoxicada em vez de pneumolisina mutacionalmente desintoxicada. Isto porque os mutantes desintoxicados obtidos até à data apresentam ainda actividade residual de toxina - e a pneumolisina quimicamente desintoxicada não. É, por isso, considerado outro aspecto da invenção que, no geral, composições compreendendo pneumolisina (ou mutantes de pneumolisina) que foram quimicamente desintoxicados para utilização numa vacina, deverão ser adjuvados com um adjuvante de Th1, de um modo preferido, 3D-MPL. Tais composições são proporcionadas pela invenção. É também considerado um método para aumentar a resposta imune da pneumolisina quimicamente desintoxicada dentro de uma composição imunogénica, compreendendo os passos de adição de um adjuvante de TH1 (de um modo preferido, 3D-MPL) à composição.

**Exemplo 4B** *Impacto benéfico da adição de um mutante atenuado de pneumolisina e adjuvante 3D-MPL na eficácia protectora da vacina de polissacárido 11-valente conjugado a PD contra colonização dos pulmões por pneumocócicos em murganhos OF1 estimulados intranasalmente com o serotipo 6B*

No presente exemplo, foi avaliada a eficácia profilática de uma vacina contendo o conjugado polissacárido 11-valente-proteína D, antigénio da pneumolisina mutante atenuado (PdB, documento WO 90/06951) e adjuvantes AlPO<sub>4</sub> + 3D-MPL, comparada

com a formulação conjugada de polissacárido 11 valente-proteína D adsorvida a AlPO4.

Grupos de 12 murganhos OF1 fêmeas com 4 semanas de idade foram imunizados subcutaneamente aos dias 0 e 14 com formulações contendo A: 50 µg de AlPO4; B: 0,1 µg de PS/serotipo de vacina polisacárida 11-valente conjugada a PD + 50 µg de AlPO4; ou C: 0,1 µg de PS/serotipo de vacina de polissacárido 11-valente conjugada a PD + 10 µg de PdB (proporcionado por J.Paton, Children's Hospital, North Adelaide, Austrália) + 50 µg de AlPO4 + 5 µg de 3D-MPL (fornecido por Ribic Immunochem). O estímulo foi efectuado ao dia 21, como descrito acima.

Como apresentado na Figura 1C, foi conferida uma protecção muito significativa ( $p < 0,007$ ) pela vacina de polissacárido 11-valente conjugada suplementada com pdB e adjuvada com AlPO4 + MPL (as barras pretas representam a média aritmética). Pelo contrário, não foi observada protecção significativa em animais imunizados com a formulação de polissacárido conjugado 11-valente /AlPO4. Este resultado provou que a adição do antigénio pneumolisina (mesmo atenuado) e adjuvante 3D-MPL aumentou a eficácia da vacina de polissacárido conjugado 11-valente contra pneumonia.

**Exemplo 4C, correlação imune da protecção apresentada no exemplo 4B**

De modo a estabelecer a correlação imune da protecção conferida no exemplo 4B, pela vacina de polissacárido conjugado 11-valente suplementada com pneumolisina mutante atenuada (PdB) e 3D-MPL, foram determinadas as respostas de anticorpo

serológicas antes da estimulação ao polissacárido 6B e PdB, como descrito acima.

Os títulos de anticorpo foram, depois, comparados aos números de colónias bacterianas determinados nos pulmões dos animais correspondentes recolhidos 6 horas após-estímulo. Os  $R^2$  foram calculados através de regressões lineares Log/Log.

Os  $R^2$  calculados foram iguais a 0,18 e 0,02 para respostas de anticorpo anti-PdD e anti-6B, respectivamente. Isto mostrou a ausência de correlação entre as respostas imunes humorais e protecção para ambos os antigénios. Os títulos de anticorpo anti-6B não foram, significativamente, diferentes nos grupos imunizados com a vacina do conjugado 11-valente (GMT = 0,318 ng/mL) ou com a mesma vacina suplementada com PdD e 3D-MPL (GMT = 0,458 ng/mL). Por isso, a melhoria na protecção observada para a formulação C não foi só devida a uma resposta de anticorpo superior ao polissacárido 6B.

Considerando, em conjunto, os resultados sugerem que a protecção não foi mediada por respostas imunes humorais isoladas, mas também por uma imunidade mediada por células induzida pelo antigénio PdB na presença de 3D-MPL. Isto deu um suporte adicional para a adição de antigénio(s) proteico(s) e adjuvante(s) potente(s) na vacina de polissacárido pneumocócico conjugado, de modo a coordenar as duas ramificações do sistema imunitário para uma protecção óptima.

**Exemplo 5 - A Cooperação de ambas as ramificações do Sistema Imunitário em murganhos activamente imunizados com pneumolisina e passivamente imunizados com anticorpos contra PS pneumocócica**

**Exemplo 5A** - Encontrar a Concentração de Anticorpo Anti-6B-Polissacárido (anti-PS) Passivamente Administrado que Protege Contra Pneumonia

Método

Grupos de Vacina: Quatro grupos de 16 murganhos foram passivamente imunizados (i.p.) no dia 1 com 100  $\mu$ L de anti-soro anti-polissacárido de rato não diluído, de acordo com os grupos apresentados em detalhe abaixo. (total de 64 murganhos)

Grupo	Especificidade	Concentração de IgG no Anti-soro
G1	$\alpha$ -PS -6B	5 $\mu$ g/mL.
G2	$\alpha$ -PS -6B	2 $\mu$ g/mL.
G3	$\alpha$ -PS -6B	0,75 $\mu$ g/mL.
G4	controlo	0 $\mu$ g/mL.

Animais: 64 murganhos machos CD-1 da Charles River, Canadá, pesando aprox. 35 g (com aprox. 10 semanas de idade).

Anestesia: Os murganhos foram anestesiados com isoflurano (3%) mais O<sub>2</sub> (1 L/min).

Organismo: *S. pneumoniae* N1387 (serotipo 6) foi recolhida de placas de agar de tripticase de soja (TSA) suplementado com

sangue de cavalo a 5% e suspenso em 6 mL de PBS. Imediatamente antes da infecção, 1 mL de suspensão bacteriana foi diluído em 9 mL de nutriente agar fundido (BBL) e mantidos a 41 °C. Os murganhos receberam aprox. 6,0 log 10 cfu/murganho num volume de 50 µL.

**Infecção:** Ao dia 0, os murganhos foram anestesiados como descrito acima e infectados com *S.pneumoniae* N1387 (50 µL de suspensão bacteriana fria) por instilação intra-bronquial via intubação intratraqueal não cirúrgica. Este método foi descrito por Woodnut e Berry (Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43: 29 (1999)).

**Amostras:** Ao dia 3 após infecção, 8 ratos/grupo foram sacrificados por overdose com CO<sub>2</sub> e os pulmões foram excisados e homogeneizados em 1 mL de PBS. Foram preparadas diluições de 10 vezes em série em PBS para enumerar os números bacterianos viáveis. As amostras foram inoculadas (20 µL) em triplicado em placas com TSA suplementado com sangue de cavalo a 5% e incubadas de um dia para outro a 37 °C antes da avaliação. Foram sacrificados mais grupos de murganhos ao dia 7 e analisadas as amostras como acima.

Resultados:

Conc. de IgG ( $\mu\text{g/mL}$ ) em soro de murganho	Números bacterianos (log 10 cfu/pulmões) a dias após infecção	
	3	8
5	6,7 $\pm$ 0,7 (1/7)	7,2 $\pm$ 0,7 (5/8)
2	6,5 $\pm$ 0,7 (1/7)	6,9 $\pm$ 1,8 (4/7)
0,75	7,7 $\pm$ 0,5 (5/8)	4,8 $\pm$ 1,4 (2/8)
0	6,7 $\pm$ 1,5 (3/6)	6,3 $\pm$ 1,5 (3/9)

Os números entre parêntesis são o número de animais que morreram antes do tempo da recolha da amostra.

Conclusão: No geral, não se verificaram diferenças significativas nos números bacterianos isolados de qualquer dos grupos de tratamento. Isto indica que não foi proporcionada protecção mensurável pelo anti-polissacárido, para concentrações até e incluindo 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Isto é semelhante ao observado em alguns ensaios clínicos em humanos, isto é, o corpo anti-polissacárido é insuficiente para proteger contra a pneumonia pneumocócica em algumas populações.

**Exemplo 5B** - Determinar a protecção da pneumonia proporcionada pela administração activa de Ply (pneumolisina) com ou sem adjuvante e sinergia com anticorpo anti-PS subóptima.

## Método

Animais: 128 murganhos machos CD-1 (6 semanas de idade na altura da imunização, 10 semanas de idade na altura da infecção) da Charles River, St. Constant, Quebec, Canadá. Os animais pesavam aprox. 20 g às 6 semanas e 38 g às 10 semanas.

Imunizações: Seis grupos de 16 murganhos foram imunizados por injeção subcutânea ao dia -22 e -14 com 100 µL de vacina, como descrito abaixo. (128 murganhos no total). O PdB (documento WO 90/06951) foi obtido por cortesia do Dr. James Paton, Austrália. O 3D-MPL foi obtido de Ribic/Corixa.

Ao dia -1, os grupos específicos (ver Tabela abaixo) foram imunizados (i.p. 100 µL) passivamente com uma concentração de 4,26 g/mL (4 mL de 5 µg/mL + 1,3 mL de 2 µg/mL) de anticorpo anti-polisacárido de murganho.

Grupo	Volume de Injeção Activa	Vacina administrada aos dias -22,-14 (dosagem em µg)	Volume de injeção Passiva	IgG Passiva (dia -1)
1-1	100 µL s.c.	PdB/AlPO <sub>4</sub> (10/50)		Nenhuma
1-2	100 µL s.c.	PdB/MPL/AlPO <sub>4</sub> (10/5/50)		Nenhuma
1-3	100 µL s.c.	PdB/AlPO <sub>4</sub> (10/50)	100 µL i.p.	α-PS
1-4	100 µL s.c.	PdB/MPL/AlPO <sub>4</sub> (10/5/50)	100 µL i.p.	α-PS
1-5	100 µL s.c.	MPL/AlPO <sub>4</sub> (5/50)	100 µL i.p.	α-PS
1-6	100 µL s.c.	MPL/AlPO <sub>4</sub> (5/50)		Nenhuma

Infecção: Ao dia 0, os murganhos foram anestesiados (isoflurano a 3% mais 1 L/min de O<sub>2</sub>). Os inóculos bacterianos foram preparados por recolha de *S. pneumoniae* N1387 (serotipo 6) de placas de agar de triptícase de soja (TSA) suplementado com sangue de cavalo a 5% e suspensas em 6 mL de PBS. Foi preparada

uma diluição de dez vezes (1 mL mais 9 mL) em agar arrefecido de nutrientes fundidos (mantido a 41 °C) imediatamente antes da infecção. Os ratos foram infectados por instilação intra-bronquial via intubação intra-traqueal e receberam, aproximadamente,  $6,0 \log_{10}$  cfu/murganho num volume de 50  $\mu$ L. Este método foi descrito por Woodnut e Berry (Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43: 29 (1999)).

Amostras: Ao dia 72 após infecção, foram sacrificados 8 murganhos/grupo por overdose de CO<sub>2</sub> e os pulmões foram excisados e homogeneizados em 1 mL de PBS. Foram preparadas diluições de dez vezes em PBS para enumerar os números bacterianos viáveis. As amostras foram inoculadas (20  $\mu$ L) em triplicado em placas de TSA suplementadas com sangue de cavalo a 5% e incubadas de um dia para o outro a 37 °C antes da avaliação. Foram sacrificados outros grupos de murganhos ao dia 8 após infecção e preparadas as amostras como anteriormente.

#### Análise de dados

A determinação do efeito para comparação do tratamento foi o número de bactérias nos pulmões aos dias 3 e 7 após infecção. Os resultados são apresentados como médias de grupo com desvios padrão. Foi efectuada análise estatística utilizando o teste t de Student, onde um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

Resultados:

*72 h após infecção*

As contagens bacterianas do grupo 1-4 foram significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) às dos grupos 1-3.

As contagens bacterianas do grupo 1-4 foram significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) às dos grupos 1-5.

*168 h após infecção*

Os números bacterianos em todos os grupos foram aprox. 2 logs inferiores no dia 8, relativamente, ao dia 3, indicando que a infecção foi resolvida.

As contagens bacterianas do grupo 1-2 foram significativamente, inferiores ( $p < 0,05$ ) relativamente às dos grupos 1-5.

Grupo	Dia 3		Dia 8	
	Log CFU/pulmão	Desvio Padrão	Log CFU/pulmão	Desvio Padrão
1-1	6,96	0,61	5,23	1,28
1-2	6,59	1,25	4,08	1,34
1-3	7,09	0,8	5,32	1,26
1-4	6,09	1,43	4,46	2,32
1-5	7,19	0,89	5,42	1,05
1-6	6,68	1,14	5,01	1,48

Como demonstrado acima, o anticorpo anti-polissacárido isolado (grupo 1-5) não proporcionou protecção contra o crescimento de pneumococos nos pulmões. O PdB adjuvado com  $AlPO_4$  também não confere protecção, mas ao dia 8 existe uma tendência para protecção quando o PdB é combinado com 3D-MPL (grupo 1-2).

Ao Dia 3, o grupo mais, significativamente, protegido, grupo 1-4, apresentou os três elementos, PdB, 3D-MPL e anticorpo anti-polissacárido passivamente administrado. Esta conclusão é suportada pela taxa de mortalidade. O grupo 1-4 apresentou apenas 2/8 mortes comparativamente a 5/10 para os grupos 1-5 e 1-3.

#### Conclusão:

Como a experiência foi efectuada com animais imunizados passivamente, o efeito sinérgico da imunização activa com pneumolisina e MPL não pode ser devido a um aumento no nível de anticorpos contra o antigénio polissacárido.

Como os animais foram apenas imunizados passivamente contra o polissacárido pneumocócico, ao dia 8 os níveis de tal anticorpo ter-se-ão dissipado, em grande parte, no hospedeiro.

Contudo, poderá ser observada uma protecção significativa contra pneumonia pneumocócica em grupos imunizados com pneumolisina mais 3D-MPL e, especialmente, em grupos imunizados com pneumolisina mais 3D-MPL mais anticorpo anti-polissacárido administrado passivamente, indicando a sinergia desta combinação.

Se a imunização anti-polissacárido tivesse sido efectuada activamente (de um modo preferido, como polissacárido conjugado), o efeito teria sido mais acentuado, na medida em que o efeito das células B de memória e níveis constantes de anticorpo anti-PS teriam contribuído para a cooperação na resposta imunitária (ver, por exemplo, Fig. 1 C, onde muitos dos animais imunizados activamente com polissacárido e proteína não apresentaram bactérias nos pulmões após estímulo).

**Exemplo 6 - Imunogenicidade em murganhos Balb/C com 1 ano de idade com vacina de polissacárido pneumocócico conjugado-Proteína D adjuvada com 3D-MPL.**

Introdução e objectivo(s):

A protecção contra infecção pneumocócica é mediada por anticorpo de serotipo específico através de fagocitose por opsonização. Pode-se desconfiar que aumentos na concentração de anticorpo irão resultar numa protecção superior e, por isso, tem sido feito um grande esforço para encontrar meios de aumentar a resposta humoral. Uma estratégia que tem sido aplicada com sucesso para conjugar vacinas em estudos pré-clínicos é a utilização de adjuvantes de imunoestimulação (revisto em Poolman *et al.*, 1998, carbohydrate-Based Bacterial Vaccines. In: Handbook of Experimental Pharmacology eds. P. Perlmann and H. Wigzell. Springer-Verlag, Heidelberg, D).

Os dados apresentados nesta secção mostram os resultados da última experiência, utilizando lotes clínicos num protocolo concebido para mimetizar um ensaio clínico.

Protocolo:

Os murganhos balb/c com um ano de idade foram imunizados com 1/10 de dose humana de vacina de polissacárido pneumocócico conjugado-proteína D ou vacina polissacárida simples 23-valente. As vacinas utilizadas foram lotes clínicos DSP009, DSP013 ou DSP014 correspondendo à dosagem de 1 mcg dos serotipos 6B e 23F e 5 mcg dos restantes serotipos da vacina conjugada 11-valente, a dosagem de 0,1 mcg da vacina conjugada 11-valente ou a dosagem de 0,1 mcg da vacina conjugada 11-valente adjuvada com 5 mcg de 3D-MPL, respectivamente. Todas as vacinas conjugadas 11-valente foram, também, adjuvadas com 50 µg de AlPO<sub>4</sub>.

Os grupos de 20 murganhos foram imunizados intramuscularmente. As injeções dos grupos listados na seguinte tabela foram efectuadas nos dias 0 e 21. As amostras de sangue de teste foram obtidas no dia 35, (14 dias depois da segunda dose).

Tabela: Calendário de Imunização para murganhos Balb/c com 1 ano de idade, imunizados com lotes clínicos de vacina conjugada de polissacárido pneumocócico -Proteína D.

<b>Grupo</b>	<b>Dia 0 Vacina Dose 1</b>	<b>Dia 21 Vacina Dose 2</b>	<b>Número de murganhos</b>
1	Pneumovax-23 2,5 mcg	Tampão	20
2a	Pn-PD 11-valente 0,1 mcg	Tampão	20
2b	Pn-PD 11-valente 0,1 mcg	Pn-PD 11-valente 0,1 mcg	20
3a	Pn-PD + MPL 11-valente 0,1 + 5 mcg	Tampão	20
3b	Pn-PD + MPL 11-valente 0,1 + 5 mcg	Pn-PD + MPL 11-valente 0,1 mcg	20
4a	Pn-PD 11-valente 1/0,5 mcg	Tampão	20
4b	Pn-PD 11-valente 1/0,5 mcg	Pn-PD 11-valente 1/0,5 mcg	20
controle	Tampão	Tampão	20

O soro foi testado por ELISA para anticorpos IgG para os polissacáridos pneumocócicos seguindo o protocolo consensual de CDC/WHO, isto é, após neutralização do soro com polissacárido da parede celular. O ELISA foi calibrado para proporcionar as concentrações de anticorpo em mcg/mL utilizando anticorpos monoclonais IgG1 de serotipo específico.

Foi calculada a análise estatística de comparações utilizando UNISTAT versão 5.0 beta. Foi efectuada a ANOVA pelo método de Tukey-HSD em concentrações de IgG transformadas em log. A comparação aos pares das taxas de seroconversão foi efectuada utilizando o teste exacto de Fisher.

### Resultados:

O GMC IgG e intervalo de confiança de 95% contra os 11 serotipos e proteína D induziu 14 dias depois da segunda imunização (dose 2) são apresentados na seguinte tabela. São apresentadas as taxas de seroconversão onde não pode ser calculado um intervalo de confiança de 95%.

O grupo 1 mostra o efeito de imunização com polissacáridos simples que normalmente induzem apenas IgM em animais. A maioria dos níveis de IgG estão abaixo do limite de detecção; contudo, os murganhos balb/c conseguiram produzir IgG para alguns polissacáridos pneumocócicos, nomeadamente, os serotipos 3, 19F e 14.

A imunização com vacinas conjugadas induziu o anticorpo IgG com taxas de seroconversão elevadas contra todos os serotipos excepto o 23F.

Foi observada uma resposta dependente da dose (grupo 4 vs grupo 2) apenas para os serotipos 7F e 19F, mas estas observações não foram estatisticamente significativas. Foi observada uma resposta superior após duas doses (grupos b vs. grupos a) para os serotipos 3, 6B, 7F e 19F, e PD, e estas

observações foram, em muitos dos casos, estatisticamente significativas para as 3 formulações.

Muito interessante é o efeito do 3D-MPL. Duas doses da vacina formulada com 3D-MPL (grupo 3b) induziram a GMC mais elevada de IgG específica e isto foi estatisticamente significativo para todos os serotipos, excepto para o 23F, o qual apresentou uma taxa de seroconversão significativamente superior ( $p = 0,02$  grupo 3b vs 2b, teste exacto de Fisher).

Tabela: Média Geométrica [IgG] e Intervalos de Confiança de 95% para Seleccionar Serotipos Pneumocócicos e Proteína D em Murganhos Balb/c com 1 Ano de Idade 14 dias Após Imunização II com Vacina Conjugada PS-PD 11-valente

Grupo	1	2a	2b	3a	3b	4a	4b
Sero-tipo	GM [IgG] µg/mL (CI 95%)						
3	0,24 (0,16-0,6)	0,18 (0,11-0,27)	0,84 (0,47-1,5)	0,72 (0,51-1,0)	4,84 (3,0-7,9)	0,22 (0,14-0,35)	0,95 (0,19-1,8)
3B	0,02 (0/20 <sup>#</sup> )	0,04 (8/19)	0,19 (0,09-0,41)	0,14 (0,07-0,27)	0,74 (0,29-1,9)	0,09 (0,05-0,16)	0,11 (0,05-0,23)
7F	0,04 (0/20 <sup>#</sup> )	0,07 (0,04-0,12)	0,19 (0,10-0,39)	0,15 (0,10-0,22)	0,97 (0,49-2,0)	0,09 (0,06-0,14)	0,45 (0,20-1,02)
14	0,15 (3/20 <sup>#</sup> )	4,5 (2,5-8,1)	6,2 (3,6-10,5)	12,9 (7,8-21,2)	13,6 (9,4-19,7)	4,0 (2,0-8,0)	6,9 (4,6-10,6)
19F	1,2 (0,56-2,6)	6,7 (3,6-12,5)	12,1 (7,6-19,3)	10,1 (5,5-18,5)	58,5 (42-81)	5,9 (3,5-9,9)	22,0 (16,0-30,2)
23F	0,07 (1/20 <sup>#</sup> )	0,08 (3/20 <sup>#</sup> )	0,08 (2/19 <sup>#</sup> )	0,07 (2/10 <sup>#</sup> )	0,17 (9/20 <sup>#</sup> )	0,06 (1/18 <sup>#</sup> )	0,10 (4/20 <sup>#</sup> )
PD*	0,25 (1/20 <sup>#</sup> )	5,2 (3,3-8,3)	11,9 (6,9-20,7)	13,5 (9,5-19,0)	98,0 (49,1-195)	10,9 (6,4-18,4)	38,7 (21,3-70,3)

\*Em EU/mL; Valor de Taxa de seroconversão, definida como 2 desvios padrão acima da média do controlo negativo.

Por favor referir à tabela anterior para as definições do grupo.

### Conclusão:

Os dados aqui apresentados demonstram que a adição de 3D-MPL à vacina conjugada de polissacárido pneumocócico 11-valente-Proteína D aumentou a resposta imune em murganhos balb/c idosos, para todos os serotipos testados.

Na maioria dos casos, duas doses de vacina induziram concentrações médias geométricas de IgG superiores relativamente a uma dose. Uma vez que isto não foi observado utilizando a vacina polissacárida simples, mesmo em humanos, é considerado uma indicação de uma resposta imune dependente de células T e a indução de memória imune.

Estes dados suportam um esquema de administração de vacina utilizando polissacáridos pneumocócicos conjugados adjuvados com adjuvantes Th1 (de um modo preferido, 3D-MPL), em que, são administradas, pelo menos, duas doses de vacina adjuvada, de um modo preferido, com 1-12 semanas de intervalo e, de um modo muito preferido, 3 semanas de intervalo. Tal esquema de administração é considerado um outro aspecto da invenção.

Os murganhos utilizados na experiência não responderam ao PS 23 (simples ou conjugada). De um modo interessante, embora os níveis de anticorpo contra o polissacárido permaneceram baixos independentemente da composição de vacina utilizada, responderam

muito mais ratos ao PS23 quando foi utilizado o 3D-MPL como adjuvante (sendo a seroconversão, significativamente, superior). Uma utilização de adjuvantes Th1, de um modo particular, 3D-MPL, em composições de vacina compreendendo polissacáridos pneumocócicos conjugados, de modo a aliviar a não resposta a um polissacárido pneumocócico numa vacina, é também um outro aspecto da invenção. Um método de aliviar a não resposta com a composição mencionada anteriormente, utilizando o esquema de administração de duas doses descrito acima é ainda outro aspecto.

**Exemplo 7 - Conjugado polissacárido de *Neisseria Meningitidis* C -Proteína D (PSC-PD)**

**A: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA D**

Como para o Exemplo 1.

**B: PREPARAÇÃO DE POLISSACÁRIDO C**

A fonte de polissacárido do grupo C é a estirpe C11 de *N. meningitidis*. Esta é fermentada utilizando técnicas de fermentação clássicas (documento EP 72513). Os polissacáridos em pó seco, utilizados no processo de conjugação são idênticos a Mencevax (SB Biologicals s.a.).

Foi descongelada uma aliquota da estirpe C11 e 0,1 mL de suspensão é riscada numa placa de Petri com meio Mueller Hinton suplementado com dialisado de extracto de levedura (10%, v/v) e

incubada durante 23 a 25 h a 36 °C numa incubadora de ar saturada com água.

O crescimento superficial é depois ressuspenso num meio de fermentação esterilizado e inoculado com esta suspensão num frasco Roux contendo meio Mueller Hinton suplementado com dialisado de extracto de levedura (10%, v/v) e esferas de vidro estéreis. Após incubação do frasco Roux durante 23 a 25 h a 36 °C numa incubadora de ar saturada com água, o crescimento de superfície é ressuspenso em 10 mL de meio de fermentação estéril e são inoculados 0,2 a 0,3 mL desta suspensão noutros 12 frascos Roux com meio Mueller Hinton.

Após incubação durante 23 a 25 h a 36 °C, numa incubadora de ar saturada com água, o crescimento de superfície é ressuspenso em 10 mL de meio de fermentação estéril. A suspensão bacteriana é colocada num frasco cónico.

Esta suspensão é depois transferida assepticamente para o fermentador utilizando seringas estéreis.

A fermentação de meningococos é efectuada em fermentadores situados numa sala limpa sob pressão negativa. A fermentação é geralmente completada após 10-12 h, correspondendo a aproximadamente  $10^{10}$  bactérias/mL (*i. e.*, a fase estacionária inicial) e detectado por aumento de pH.

Nesta fase, o caldo inteiro é inactivado por aquecimento (12 min a 56 °C) antes da centrifugação. Antes e depois da inactivação, é retirada uma amostra do caldo e semeada em placas de petri com meio Mueller Hinton.

## **C: PURIFICAÇÃO DE PS**

O processo de purificação é um processo de múltiplos passos efectuado no caldo de fermentação total. Na primeira fase de purificação, a cultura inactivada é clarificada por centrifugação e o sobrenadante é recuperado.

A purificação de polissacárido é baseada na precipitação com um sal de amónio quaternário (Brometo de cetiltrimetilamónio/CTAB, CETAVLON R). O CTAB forma complexos insolúveis com polianiões, tais como polissacáridos, ácidos nucleicos e proteínas, dependendo do seu pI. Segundo condições iónicas controladas, este método pode ser utilizado para precipitar impurezas (baixa condutividade) ou polissacáridos (elevada condutividade).

Os polissacáridos incluídos no sobrenadante clarificado são precipitados utilizando terra de diatomáceas (CELITE<sup>R</sup> 545) como matriz, para evitar a formação de massa inerte insolúvel durante as diferentes precipitações/purificações.

### ***Esquema de purificação de polissacárido C de N. meningitidis.***

**Passo 1:** Fixação do complexo PSC-CTAB em CELITE<sup>R</sup> 545 e remoção de detritos celulares, ácidos nucleicos e proteínas por lavagem com CTAB a 0,05%.

**Passo 2:** Eluição de PS com EtOH a 50%. As primeiras fracções que são túrbidas e contêm impurezas e LPS são

rejeitadas. A presença de PS nas seguintes reacções é verificada através do teste de floculação.

**Passo 3:** Re-fixação do complexo PS-CTAB em CELITE<sup>R</sup> 545 e remoção de ácidos nucleicos mais pequenos e proteínas por lavagem com CTAB a 0,05%.

**Passo 4:** Eluição de PS com EtOH a 50%. As primeiras fracções turbidas foram rejeitadas. A presença de PS nas seguintes fracções é verificada através do teste de floculação.

O eluato é filtrado e o filtrado contendo o polissacárido em bruto é recolhido. O polissacárido é precipitado a partir do filtrado por adição de etanol para uma concentração final de 80%. O polissacárido é, depois, recuperado como um pó branco, seco por vácuo e armazenado a -20 °C.

## **D: CONJUGAÇÃO DE CDAP**

### ***Conjugação de PSC e PD***

Para a conjugação de PSC e PD, foi preferida à tecnologia de conjugação de CDAP em relação à activação de CNBr clássica e ligação via um espaçador ao veículo proteico. O polissacárido é activado inicialmente por cianilação com tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). O CDAP é um reagente de cianilação solúvel em água no qual a electrofilicidade do grupo ciano é aumentada em relação ao CNBr, permitindo que seja efectuada a reacção de cianilação sob condições relativamente moderadas. Após activação, o polissacárido pode ser associado directamente ao veículo proteico através dos seus grupos amino, sem introduzir qualquer molécula espaçadora. Os grupos éster de

cianeto que não reagiram são eliminados através de uma reacção extensa com glicina. O número total de passos envolvidos na preparação de vacinas conjugadas é reduzido e muito importante, não estão presentes moléculas espaçadoras potencialmente imunogénicas no produto final.

A activação de polissacáridos com CDAP introduz um grupo cianato nos polissacáridos e é libertada a dimetilaminopiridina (DMAP). O grupo cianato reage com os grupos NH<sub>2</sub> na proteína durante o processo subsequente de ligação e é convertido num carbamato.

#### *Activação de PSC e ligação de PSC-PD*

A activação e ligação são efectuadas a +25 °C.

Foram dissolvidas 120 mg de PS durante, pelo menos, 4 h em WFI.

Foi adicionada uma solução de CDAP (100 mg/mL preparada de fresco em acetonitrilo) para obter uma proporção CDAP/PS (p/p) de 0,75.

Após 1 min 30, o pH é elevado para pH de activação (pH 10), por adição de trietilamina e é estabilizado para adição de PD.

Ao tempo de 3 min 30, é adicionado NaCl para uma concentração final de 2 M.

Ao tempo de 4 min, é adicionado PD purificado para atingir uma proporção PD/PS de 1,5/1; o pH é imediatamente ajustado para

pH de ligação (pH 10). A solução é mantida em repouso 1 h sob pH de regulação.

#### *Inactivação*

São adicionados 6 mL de uma solução de glicina 2 M à mistura PS/PD/CDAP. O pH é ajustado para pH de inactivação (pH 8,8). A solução é agitada, durante 30 min, à temperatura ambiente, depois de um dia para o outro a +2-8 °C, com agitação contínua lenta.

#### *Purificação de PS-PD*

Após filtração (5 µm), o conjugado PS-PD é purificado numa sala fria por cromatografia de permeação gel, num gel Sephacryl<sup>TM</sup> S400HR, para remover pequenas moléculas (incluindo DMAP) e PD não conjugado: Eluição - NaCl 150 mM pH 6,5; Monitorização - UV 280 nm, pH e condutividade.

Com base nos diferentes tamanhos moleculares dos componentes da reacção, os conjugados PS-PD são eluídos inicialmente, seguidos pelo PD livre e, finalmente, por DMAP. As fracções contendo conjugados, como detectado por DMAB (PS) e µBCA (proteína), são reunidas. As fracções reunidas são esterilizadas por filtração (0,2 µm)

## **E: FORMULAÇÃO DE VACINA DE CONJUGADO PSC-PD ADSORVIDO**

### *Lavagem de $AlPO_4$*

De modo a otimizar a adsorção do conjugado PSC-PD em  $AlPO_4$ , o  $AlPO_4$  é lavado para reduzir a concentração em  $PO_4^{3-}$ :

- o  $AlPO_4$  é lavado com NaCl 150 mM e centrifugado (4x);
- o sedimento é, depois, ressuspenso em NaCl 150 mM e, depois, filtrado (100  $\mu$ m); e
- o filtrado é esterilizado por aquecimento.

Este  $AlPO_4$  lavado é referido como WAP (fosfato autoclavado lavado).

### *Processo da Formulação*

A carga do conjugado PSC-PD é adsorvido em  $AlPO_4$  WAP antes da formulação final do produto final. O  $AlPO_4$  WAP é agitado com PSC-PD, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 5,1 e a mistura foi agitada durante mais 18 horas à temperatura ambiente. Foi adicionada solução de NaCl a 150 mM e a mistura foi agitada, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Foi adicionado 2-fenoxietanol a 5 mg/mL e a mistura foi agitada, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, depois o pH foi ajustado para pH 6,1.

### *Composição final/dose*

-PSC-PD:	10 µg de PS
-AlPO <sub>4</sub> WAP:	0,25 mg de Al <sup>3+</sup>
-NaCl:	150 mM
-2-fenoxi-etanol:	2,5 mg
-Água para injeção:	para 0,5 mL
-pH:	6,1

## **F: INFORMAÇÃO PRÉ-CLÍNICA**

### *Imunogenicidade do conjugado polissacárido em murganhos*

A imunogenicidade do conjugado PSC-PD tem sido avaliada em murganhos Balb/C com 6 a 8 semanas de idade. O conjugado simples (não adsorvido) ou o conjugado adsorvido em AlPO<sub>4</sub> foi injectado como uma vacina monovalente. Os anticorpos anti-PSC induzidos foram determinados por ELISA, enquanto os anticorpos funcionais foram analisados utilizando o teste bactericida, sendo ambos os métodos baseados nos protocolos do CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA). São apresentados os resultados de duas experiências diferentes efectuadas para avaliar a resposta *versus* a dose e efeito do adjuvante (AlPO<sub>4</sub>).

### *Experiência da gama de dosagem*

Nesta experiência, o PSC-PD foi injectado duas vezes (com duas semanas de intervalo) em murganhos Balb/C. Foram utilizadas quatro doses diferentes de conjugado formulado em AlPO<sub>4</sub>: 0,1;

0,5; 2,5; e 9,6 µg/animal. Os ratos (10/grupo) foram sangrados ao dia 14 (14 Pós I), 28 (14 Pós II) e 42 (28 Pós II). As concentrações médias geométricas (GMC) de anticorpos específicos para polissacárido C, determinados por ELISA, foram expressos em µg de IgG/mL, utilizando IgG purificada como referência. Os anticorpos bactericidas foram determinados no soro reunido e os títulos expressos como recíprocos da diluição capaz de matar 50% das bactérias, utilizando a estirpe C11 de *N. meningitidis* na presença de complemento de coelhos bebé.

A resposta à dose obtida mostra uma estabilização da dose de 2,5 µg. Os resultados indicaram que existiu uma boa resposta de reforço entre 14 Após I e 14 Após II. Os níveis de anticorpo a 28 Após II são, pelo menos, equivalentes aos de 14 Após II. Os títulos de anticorpo bactericida são concordantes com concentrações de ELISA e confirmam a imunogenicidade do conjugado PSC-PD.

#### *Efeito do adjuvante*

Nesta experiência, foi avaliado um lote de conjugado PSC-PD formulado em AlPO<sub>4</sub>, o conjugado simples (não adjuvado) foi injectado para comparação. Foram injectados 10 murganhos/grupo duas vezes, com duas semanas de intervalo, através da via subcutânea, com 2 µg do conjugado. Os murganhos foram sangrados nos dias 14 (14 Pós I), 28 (14 Pós II) e 42 (28 Pós II), e determinados os títulos de anticorpo funcionais e por ELISA (apenas no dia 14 Após II e 28 Após II para o teste bactericida). A formulação com AlPO<sub>4</sub>, induz até cerca de 10 vezes mais títulos de anticorpo quando comparada com formulações não adjuvadas.

### *Conclusões*

Podem ser feitas as seguintes conclusões gerais a partir dos resultados das experiências descritas acima:

- O conjugado PSC-PD induz uma resposta anamnésica, demonstrado que o PSC, quando conjugado, torna-se um antigénio dependente de células T.

- As concentrações de anticorpo anti-PSC determinadas por ELISA correlacionam-se bem com os títulos de anticorpo bactericida, mostrando que os anticorpos induzidos pelo conjugado PSC-PD são funcionais contra o serogrupo C do *N. meningitidis*.

- Aproximadamente 2,5 µg de conjugado adsorvido em AlPO<sub>4</sub> parecem induzir uma resposta de anticorpo óptima em murganhos.

- A química do CDAP parece ser um método adequado para tornar imunogénicos os conjugados PSC-PD.

### **Exemplo 8-Preparação de um Conjugado Polissacárido do Serogrupo A de *N. meningitidis* - PD**

Um pó seco do polissacárido A (PSA) é dissolvido durante uma hora numa solução de NaCl 0,2 M para uma concentração final de 8 mg/mL. O pH é depois fixo para um valor de 6 com HCl ou NaOH e a solução é regulada termicamente para 25 °C. São adicionadas 0,75 mg de CDAP/mg de PSA (uma preparação para 100 mg/mL de acetonitrilo) à solução de PSA. Após 1,5 minutos sem regulação de pH, é adicionado NaOH 0,2 M para obter um pH de 10. 2,5 minutos mais tarde, é adicionada a proteína D

(concentrada para 5 mg/mL) de acordo com uma proporção PD/PSA de, aproximadamente, 1. É mantido um pH de 10, durante o período de reacção de ligação de 1 hora. Depois, são adicionadas 10 mg de glicina (2 M pH 9,0)/mg de PSA e o pH regulado para um valor de 9,0 durante 30 minutos a 25 °C. A mistura é, depois, conservada de um dia para o outro a 4 °C antes da purificação por cromatografia em coluna de exclusão (Sephacryl S400HR de Pharmacia). Primeiro é eluído o conjugado, seguido por PD que não reagiu e produto secundário (DMAP, glicina, sais). O conjugado é recolhido e esterilizado por filtração através de uma membrana Sartopore de 0,2 µm da Sartorius.

**Exemplo 9 - Caracterização *in vitro* dos produtos dos Exemplos 7 e 8**

As características principais estão aqui resumidas na tabela abaixo:

Nº	Descrição do conjugado	Conteúdo em Proteína e PS (µg/ml)	Proporção PS/proteína (p/p)	Proteína Livre (%)	PS Livre (%)
1	PS C-PD NaOH para regulação de pH	PD : 210 PS : 308	1/0,68	<2	8-9
2	PS C-PD TEA para regulação de pH	PD : 230 PS : 351	1/0,65	<2	5-6
3	PS A-PD NaOH para regulação de pH	PD : 159 PS : 149	1/1,07	5	5-9

### *Resultados in vivo*

Foram utilizados murganhos Balb/C como modelo animal para testar a imunogenicidade dos conjugados. Os conjugados foram adsorvidos em  $\text{AlPO}_4$  ou  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (10  $\mu\text{g}$  de PS em 500  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{3+}$ ) ou não adsorvido. Os murganhos foram injectados como se segue: 2 injeções com duas semanas de intervalo (2  $\mu\text{g}$  de PS/injecção).

A partir destes resultados, pode-se concluir que o PS livre influencia, de um modo significativo, a resposta imune. Foram obtidos melhores resultados com conjugados com menos de 10% de PS livre. As melhorias acima no processo CDAP são, assim, um outro aspecto da invenção.

A formulação é também importante. O  $\text{AlPO}_4$  parece ser o adjuvante mais apropriado neste modelo. Os conjugados induzem um efeito de reforço que não é observado quando os polissacáridos são injectados individualmente.

### *Conclusões*

Os conjugados de *N. meningitidis* A e C foram obtidos com uma proporção PS/proteína final de 1 e 0,6-0,7 (p/p), respectivamente. O PS livre e o veículo proteico livre estavam abaixo dos 10% e 15%, respectivamente. A recuperação do polissacárido é superior a 70%. Os conjugados de PSA e PSC obtidos pelo processo CDAP melhorado (optimizado) acima (independentemente do veículo proteico mas, de um modo preferido, proteína D) são, assim, um outro aspecto da invenção.

### **Exemplo 10—Preparação de um Conjugado Polissacárido de *H. influenzae* b-PD**

O *H. influenzae* b é uma das causas principais de meningite em crianças com menos de 2 anos de idade. O polissacárido capsular de *H. influenzae* (PRP) como um conjugado em toxóide do tétano é bem conhecido (conjugado por química desenvolvida por J. Robbins). O CDAP é uma química melhorada. O que se segue é a descrição das condições óptimas de CDAP encontradas para conjugar o PRP, de um modo preferido, a PD.

Os parâmetros que influenciam a reacção de conjugação são os seguintes:

- A concentração inicial de polissacárido (que pode ter um impacto duplo nos níveis finais de polissacárido livre e no passo de esterilização por filtração).
- A concentração inicial do veículo proteico.
- A proporção inicial do polissacárido para proteína (que pode também ter um duplo impacto nos níveis finais de polissacárido livre e no passo de esterilização por filtração).
- A quantidade de CDAP utilizado (normalmente num excesso elevado).
- A temperatura da reacção (que pode influenciar a degradação do polissacárido, as cinéticas da reacção e a degradação dos grupos reactivos).

- O pH de activação e ligação.
- O pH de inactivação (influenciando o nível de DMAP residual).
- O tempo de activação, ligação e inactivação.

Os presentes requerentes verificaram que os 3 parâmetros mais críticos para otimizar a qualidade do produto final são: a proporção inicial do polissacárido/proteína; a concentração inicial do polissacárido; e o pH de ligação.

O cubo reaccional foi, assim, concebido com as 3 condições acima como os três eixos. Os pontos centrais (e gama de valores experimentados) para estes eixos foram: proporção PS/proteína - 1/1( $\pm 0,3/1$ ); [PS] = 5 mg/mL ( $\pm 2$  mg/mL); e pH de ligação = 8,0 ( $\pm 1,0$  unidade de pH).

Os parâmetros menos essenciais foram fixos como se segue: foram utilizadas 30 mg de polissacárido; temperatura de 25 °C; [CDAP] = 0,75 mg/mg de PS; pH titulado com NaOH 0,2 M; pH de activação = 9,5; temperatura para activação = 1,5 minutos; temperatura de ligação - 1 hora; [proteína] = 10 mg/mL; pH de inactivação = 9,0; temperatura de inactivação = 1 hora; temperatura de dissolução do PS em solvente = 1 hora em NaCl 2 M; purificação em Sephacryl S-400HR eluída com NaCl 150 mM a 12 cm/hora; e esterilizado por filtração com um SARTOLAB P20 a 5 mL/min.

Os dados analisados para estabelecer as condições óptimas quando se prepara produtos dentro do cubo reaccional mencionado

anteriormente foram: dados do processo - rendimento máximo após filtração, nível máximo de proteína incorporada; e qualidade dos dados do produto - proporção PS/proteína final, nível de PS livre, nível de proteína livre, níveis mínimos de DMAP residual (um produto da degradação do CDAP).

#### *Rendimento da filtração.*

O factor que afecta o rendimento após filtração é a interacção entre o [PS] inicial e o pH de ligação e proporção PS/proteína inicial. A [PS] baixas existe pouca interacção com os últimos 2 factores e resulta sempre numa boa capacidade de filtração (aprox. 95% para todos os produtos). No entanto, a concentrações elevadas a capacidade de filtração diminui se o pH e a proporção inicial aumenta ([PS] elevada, proporção mais baixa, pH mais baixo = 99% de filtração; mas [PS] elevado, proporção e pH mais elevado = 19% de filtração).

#### *Nível de incorporação da proteína*

A proporção da proporção final de PS/proteína em relação à proporção inicial é uma medida da eficácia de ligação. A [PS] elevada, o pH não afecta a proporção das proporções. No entanto, a proporção inicial afecta (1,75 a proporção inicial baixa, 1,26 a proporções iniciais elevadas). A [PS] baixa, a proporção das proporções é, quase sempre, baixa, no entanto o pH agora apresenta mais que um efeito (pH baixo, proporção baixa = 0,96; pH baixo, proporção elevada = 0,8; pH elevado, proporção baixa = 1,4; e pH elevado, proporção elevada = 0,92).

### *Proporção PS/proteína final*

A proporção final depende a proporção inicial e da [PS]. As proporções finais mais significativas são obtidas com uma combinação de proporções iniciais elevadas e [PS] elevada. O efeito do pH na proporção final não é tão significativo como uma [PS] fraca.

### *Nível de proteína D livre*

As quantidades mais baixas da proteína D livre são observadas a pH elevado e [PS] elevada (níveis próximos de 0,0). O efeito de [PS] elevadas torna-se especialmente acentuadas quando o pH é baixo. O aumento da proporção inicial contribui um pouco para o aumento na proteína D livre.

### *DMAP residual*

A proporção inicial não tem um efeito significativo. Em contraste, o nível de DMAP aumenta com a [PS] e diminui quando o pH é aumentado.

### *Conclusões*

As condições de conjugação mais preferidas são, deste modo, as que se seguem: pH de ligação = 9,0; [PS] = 3 mg/mL; e proporção inicial = 1/1. Com tais condições, as características do produto final são como se seguem:

Proporção final PS/proteína		Rendimento de PS da filtração (%)		Proporção das proporções		Proteína D livre (%)		Níveis de DMAP (ng/10 µg de PS)	
valor	gama	valor	gama	valor	gama	valor	gama	valor	gama
1,10	0,91-1,30	92,6	50,138	1,16	1,03-1,29	0,71	0-10,40	4,95	2,60-7,80

Os conjugados de PRP passíveis de obtenção através do processo CDAP melhorado (otimizado) acima (independentemente do veículo proteico, mas de um modo preferido, proteína D) é, assim, um outro aspecto da invenção.

**Exemplo 11: Proteína D como um antigénio - como a sua eficácia protectora contra *H.influenzae* não-tipável pode ser melhorada por formulação desta com 3D-MPL**

Os murganhos fêmeas Balb/c (10 por grupo) foram imunizados (intramuscularmente) com a vacina conjugada polissacárido pneumocócico onze-valente-proteína D pela primeira vez com 20 semanas (D0) e receberam uma segunda imunização duas semanas mais tarde (D14). O sangue foi recolhido 7 dias depois da segunda imunização. Os títulos de anticorpo contra proteína D foram determinados em termos de quantidade de anticorpo do tipo IgG1, IgG2a e IgG2b.

As vacinas undecavalentes secas por congelação (sem AlPO<sub>4</sub>) foram preparadas por combinação dos conjugados com lactose a 15,75%, agitação durante 15 minutos à temperatura ambiente, ajustando o pH para 6,1 ±0,1 e liofilização (o ciclo começa normalmente a -69 °C, ajustando gradualmente para -24 °C durante 3 horas, depois mantendo esta temperatura durante 18 horas,

depois ajustando gradualmente para -16 °C, durante 1 hora, depois, mantendo esta temperatura durante 6 horas, depois ajustando gradualmente para +34 °C durante 3 horas e, finalmente, mantendo esta temperatura durante 9 horas).

A composição das formulações e reconstituintes para os liofilizados são apresentadas na Tabela 13.

A medida mais característica para se determinar se ocorreu uma resposta imune mediada por células do tipo Th1 é conhecida como estando correlacionada com o nível de anticorpo IgG2a. Como pode ser observado a partir dos dados, é observado um aumento surpreendentemente grande em IgG2a se a proteína D tiver sido liofilizada com um adjuvante Th1 (neste caso o 3D-MPL).

**Tabela 13: Composição de formulações (por dose para humanos) e títulos de anticorpo contra proteína D em murganhos (com 1/10 da dose)**

Estado Físico	PS (/500 µL)	AlPO <sub>4</sub> (/500 µL)	Imunoesti- mulante	Agente de aglutinação	Conser- vante	Reconsti- tuinte	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG1	IgG2a	IgG2b
							µg/mL			%		
líquido	1 µg	500 µg	Não	não	2-PE <sup>3</sup>	não	76	0,425	0,24	99,1	0,554	0,313
líquido	5 µg	500 µg	Não	não	2-PE	não	66	0,284	0,176	99,3	0,427	0,265
líquido	1 µg	0 µg	Não	não	2-PE	não	6,6	0,207	0,036	96,4	3,02	0,526
líquido	5 µg	0 µg	Não	não	2-PE	não	5,2	0,169	0,043	96,1	3,12	0,795
liofilizado	1 µg	0 µg	Não	lactose a 3,15%	não	NaCl 150 mM <sup>1</sup>	5,2	0,147	0,046	96,4	2,73	0,853
liofilizado	5 µg	0 µg	Não	lactose a 3,15%	não	NaCl 150 mM <sup>1</sup>	11,1	0,11	0,168	97,6	0,967	1,477
liofilizado	1 µg	0 µg	Não	lactose a 3,15%	não	AlPO <sub>4</sub> 500 µg <sub>2</sub>	45	1,86	0,075	95,9	3,96	0,160
liofilizado	5 µg	0 µg	Não	lactose a 3,15%	não	AlPO <sub>4</sub> 500 µg <sub>2</sub>	19	0,077	0,119	99,0	0,401	0,620
liofilizado	1 µg	0 µg	Não	lactose a 3,15%	não	MPL 50 µg <sup>1</sup>	45	2,6	3,5	88,1	5,09	6,849
liofilizado	5 µg	0 µg	Não	lactose a 3,15%	não	MPL 50 µg <sup>1</sup>	135	25	5,1	81,8	15,1	3,089
liofilizado	1 µg	0 µg	MPL (50 µg)	lactose a 3,15%	não	tampão <sup>1</sup>	43	22	5,7	60,8	31,1	8,062
líquido	1 µg	500 µg	MPL (50 µg)	não	2-PE	não	441	7,1	9,1	96,5	1,55	1,990
líquido	5 µg	500 µg	MPL (50 µg)	não	2-PE	não	299	1,4	0,899	99,2	0,465	0,298

<sup>1</sup>antes da injeção; <sup>2</sup>+/- 2 horas antes da injeção; <sup>3</sup>2-fenoxietanol

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogénica compreendendo vários antigénios conjugados polissacáridos que consistem de um antigénio polissacárido derivado de uma bactéria patogénica conjugado a proteína D de *Haemophilus influenzae* ou um seu fragmento de proteína D compreendendo epitopos de células T de auxílio.
  
2. Composição imunogénica, como reivindicado na reivindicação 1, em que os antigénios polissacáridos são seleccionados do grupo consistindo de: polissacáridos Vi de *Salmonella typhi*, polissacáridos meningocócicos, polissacáridos e polissacáridos modificados do grupo B de meningocócicos, polissacáridos de *Staphylococcus aureus*, polissacáridos de *Streptococcus agalactiae*, polissacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, polissacáridos de Micobactéria, polissacárido de *Cryptococcus neoformans*, lipopolissacáridos de *Haemophilus influenzae* não-tipáveis, polissacárido capsular de *Haemophilus influenzae* b, lipopolissacáridos de *Moraxella catharralis*, lipopolissacáridos de *Shigella sonnei* e lipopetidofosfoglicano (LPPG) de *Trypanosoma cruzi*.
  
3. Composição imunogénica, como reivindicado na reivindicação 2, compreendendo antigénios polissacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de, pelo menos, quatro serotipos de *Streptococcus pneumoniae*.
  
4. Composição imunogénica da reivindicação 2, em que os antigénios polissacáridos conjugados a proteína D são

derivados de uma combinação dos serotipos A, C ou Y de *N. meningitidis*.

5. Composição imunogénica da reivindicação 1, compreendendo polissacáridos capsulares conjugados de *Haemophilus influenzae b*, meningocócus C e meningocócus Y, em que os antígenios polissacáridos capsulares são conjugados a proteína D de *H. influenzae*, com a condição de que o polissacárido capsular de *Haemophilus influenzae b* é conjugado ao toxóide do tétano.
6. Composição imunogénica da reivindicação 1, compreendendo polissacáridos capsulares conjugados de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae b*, meningocócus C e meningocócus Y, em que os antígenios polissacáridos capsulares são conjugados a proteína D de *H. influenzae*, com a condição de que o polissacárido capsular de *Haemophilus influenzae b* é conjugado ao toxóide do tétano.
7. Composição imunogénica, como reivindicado em qualquer das reivindicações anteriores compreendendo adicionalmente um adjuvante.
8. Composição imunogénica, como reivindicado na reivindicação 7, em que os antígenios conjugados polissacárido-proteína D estão adsorvidos em fosfato de alumínio.
9. Composição imunogénica, como reivindicado na reivindicação 7, em que o adjuvante é um indutor preferido de uma resposta TH1.

10. Composição imunogénica, como reivindicado na reivindicação 9, em que o adjuvante compreende, pelo menos, um dos seguintes: 3D-MPL, um imunoestimulante de saponina ou um oligonucleótido CpG imunoestimulador.
11. Composição imunogénica, como reivindicado em qualquer das reivindicações anteriores, para utilização como um medicamento.
12. Vacina compreendendo a composição imunogénica das reivindicações 1-10.
13. Método de produção de uma composição imunogénica para várias bactérias patogénicas, compreendendo os passos de:
  - isolamento de vários antigénios polissacáridos a partir das referidas bactérias patogénicas;
  - activação dos polissacáridos;
  - conjugação dos polissacáridos a proteína D de *H. influenzae*; e
  - mistura dos polissacáridos uns com os outros.
14. Utilização de uma quantidade eficaz da composição imunogénica, como reivindicado em qualquer das reivindicações anteriores, na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de infecção por uma bactéria patogénica.

Lisboa, 10 de Março de 2008

Figura 1A

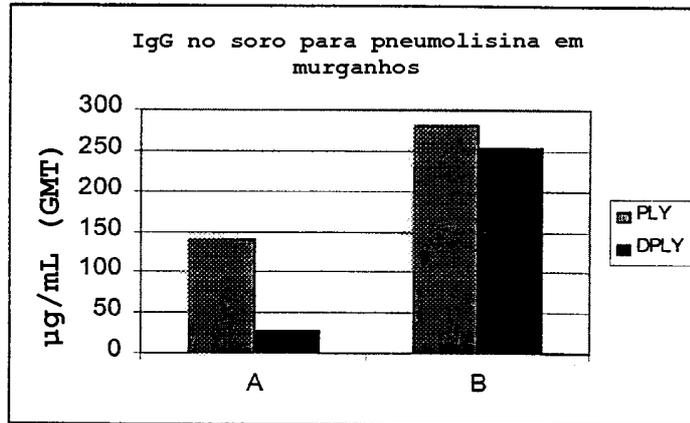


Figura 1B

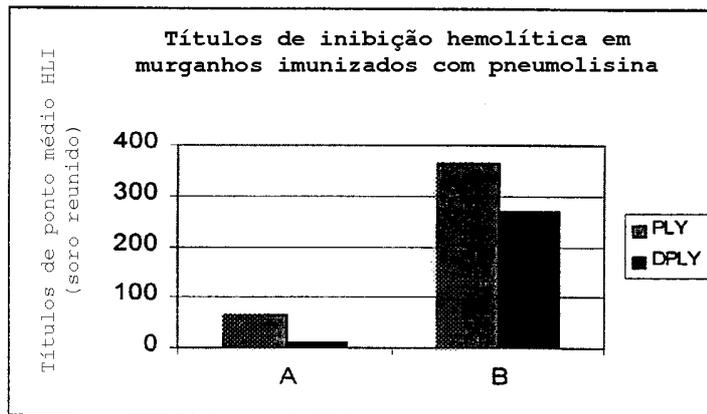


Figura 1C

