

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

(21) **PI 1003753-5 A2**

(22) Data de Depósito: 28/09/2010  
(43) Data da Publicação: 22/01/2013  
(RPI 2194)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 39/10  
A61K 39/09  
A61P 31/04

**(54) Título:** COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS SINÉRGICAS BASEADAS EM ANTÍGENOS PROTÉICOS COMBINADOS COM ANTÍGENO CELULAR PERTUSSIS E TOXINAS INATIVADAS

**(73) Titular(es):** Fundação Butantan

**(72) Inventor(es):** Eliane Namie Miyaji , Isaías Raw, Maria Leonor Sarno de Oliveira, Paulo Lee Ho

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS SINÉRGICAS BASEADAS EM ANTÍGENOS PROTÉICOS COMBINADOS COM ANTÍGENO CELULAR PERTUSSIS E TOXINAS INATIVADAS. A presente invenção refere-se a composições imunogênicas sinérgicas para prevenção de coqueluche e de infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*. Adicionalmente, as composições da presente invenção podem oferecer proteção contra infecções causadas por outros patógenos através da combinação sinérgica de antígenos dos mesmos. Em particular, a presente invenção fornece composições imunogênicas sinérgicas que compreendem ao menos um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada e ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas. A presente invenção fornece ainda fornece composições imunogênicas sinérgicas que compreendem ao menos um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada, ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas e uma ou mais toxinas diftéricas e/ou tetânicas. A presente invenção refere-se também ao uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, da presente invenção na manufatura de vacinas combinadas para prevenção contra coqueluche, tétano, difteria e/ou infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*. A presente invenção refere-se ainda ao uso das composições da presente invenção na manufatura de vacinas para prevenção contra coqueluche, tétano, difteria e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:  
**"COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS SINÉRGICAS BASEADAS EM ANTÍGENOS  
PROTÉICOS COMBINADOS COM ANTÍGENO CELULAR PERTUSSIS E  
TOXINAS INATIVADAS"**

5           CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições imunogênicas sinérgicas para prevenção de coqueluche e de infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*. Adicionalmente, as composições da presente invenção podem  
10 oferecer proteção contra infecções causadas por outros patógenos através da combinação sinérgica de antígenos dos mesmos.

Em particular, a presente invenção fornece composições imunogênicas sinérgicas que compreendem ao menos um  
15 antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada e ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas.

A presente invenção fornece ainda fornece composições  
20 imunogênicas sinérgicas que compreendem ao menos um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada, ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas e uma ou mais toxinas

diftéricas e/ou tetânicas.

A presente invenção refere-se também ao uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, da presente invenção na manufatura de vacinas combinadas para prevenção  
5 contra coqueluche, tétano, difteria e/ou infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

A presente invenção refere-se ainda ao uso das composições da presente invenção na manufatura de vacinas para prevenção contra coqueluche, tétano, difteria e  
10 infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

#### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

##### **Vacinas de *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é um dos principais agentes causadores de doenças respiratórias que,  
15 dependendo de alguns fatores como idade e estado imunológico do indivíduo, podem evoluir para um quadro sistêmico ou doenças graves como meningite. As doenças pneumocócicas matam aproximadamente 800.000 crianças por ano em todo o mundo. Em países em desenvolvimento, as  
20 mortes por estas infecções representam 5% do total de mortes infantis anuais. Além disso, o pneumococo causa doenças menos graves do trato respiratório superior de alta incidência em crianças, como otite média e sinusite.

A cápsula polissacarídica que envolve o pneumococo é

altamente variável e determina a classificação da bactéria em mais de 90 sorotipos. Apesar de não apresentarem reatividade cruzada entre si, os polissacarídeos capsulares são atualmente os únicos princípios ativos das vacinas  
5 contra *S. pneumoniae* comercialmente disponíveis.

A Pneumovax 23 (Merck & CO, Inc.) é uma vacina composta por polissacarídeos capsulares de 23 sorotipos de pneumococos prevalentes no hemisfério norte. Além da complexidade de sua produção, que envolve a fermentação de  
10 23 cepas de pneumococo e purificação de seus polissacarídeos, esta vacina é pouco eficaz em crianças menores de dois anos e em idosos, dois grupos de risco para as doenças pneumocócicas.

Já a Prevnar (PCV7, Wyeth Pharmaceuticals) é uma  
15 vacina composta por polissacarídeos de 7 sorotipos de pneumococo prevalentes nos Estados Unidos, conjugados a um componente protéico, o toxóide diftérico CRM<sub>197</sub>. Por ação do referido componente protéico, esta vacina é eficaz em crianças menores de dois anos e em idosos, mas apresenta  
20 cobertura limitada, que varia de acordo com os sorotipos circulantes nas diferentes partes do mundo. No Brasil, a estimativa de cobertura oferecida por esta vacina é de cerca de 52% (Brandileone MCC. et al. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 187:1206-1212).

Novas versões de vacinas conjugadas são compostas por polissacarídeos de 10 ou 13 sorotipos diferentes e aumentam consideravelmente a cobertura contra os sorotipos causadores de doenças. Entretanto, alguns estudos realizados após a introdução da vacina PCV7 em diferentes países mostram um aumento de doenças causadas por sorotipos não presentes nas vacinas (Ghaffar F. *et al. Clinical Infectious Diseases* 2004; 39:930-938; Jacobs MR. *et al. Laryngoscope* 2007; 117:295-298; Kaplan SL. *et al. Pediatrics* 2010; 125:429-436), o que pode ocorrer também com as vacinas compostas por 10 ou 13 polissacarídeos. Assim, os altos custos de produção e a potencial substituição de sorotipos prevalentes alguns anos após a introdução da vacinação são fatores que levam diferentes grupos de pesquisa a estudar novas alternativas nesta área.

Ao longo da última década, muito se descobriu sobre os fatores de virulência do pneumococo e o papel de cada um deles durante a evolução das doenças (Tai SS. *Critical Reviews in Microbiology* 2006; 32:139-153). Além da cápsula polissacarídica, que cobre a superfície da bactéria e participa na evasão do sistema imune, diversas proteínas se projetam para o meio externo e assim interagem com células epiteliais e endoteliais, promovendo adesão e invasão do patógeno, e com componentes do sistema imune.

Dentro desta definição encontram-se as diferentes variantes da Proteína de Superfície A de Pneumococo - "Pneumococcal Surface Protein A" (PspA), as quais estão entre os mais promissores candidatos vacinais propostos. Seu potencial protetor foi demonstrado em diferentes modelos de apresentação e desafios em animais (Briles DE. et al. *Vaccine* 2000;18:1707-1711; Briles DE. et al. *Infection and Immunity* 2000;68:796-800; Arêas APM. et al. *Infection and Immunity* 2005;73:3810-3813; Ogunniyi AD. et al. *Infection and Immunity* 2007;75:350-357; Ferreira DM. et al. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008;15:499-505; pedido de patente PI 9908649-2 A2, pedido de patente PI 0011478-2 A2, Patente US 5,679,768 e Patente US 5,804,193).

As proteínas PspA apresentam massa molecular entre 67 e 99 kDa (Waltman WD. et al. *Microbial Pathogenesis* 1990; 8:61-69) sendo divididas em 4 regiões: a região N-terminal de  $\alpha$ -hélice altamente carregada, a região rica em resíduos de prolina, a região de ligação à colina e uma cauda C-terminal de 17 aminoácidos com caráter hidrofóbico. Com base na sequência de aminoácidos da região imediatamente anterior à região rica em resíduos de prolina (CDR - Região Definidora do Clado - "Clade-Defining Region"), as PspA foram agrupadas em 6 clados que são separados em 3 famílias (Hollingshead S. et al. *Infection and Immunity* 2000;

68:5889-5900).

Um dos problemas relacionados à escolha de PspA como componente vacinal é a relativa variabilidade que esta proteína apresenta nos diversos isolados (Hollingshead S. *et al. Infection and Immunity* 2000;68:5889-5900). Dados de isolados obtidos em diversas partes do mundo mostram que mais de 90% dos isolados expressam PspA pertencentes às famílias 1 e 2 (Briles DE. *et al. Vaccine* 2000;18:1707-1711). Na América do Sul, estudos feitos no Brasil (Brandileone MCC. *et al. Vaccine* 2004; 22:3890-3896) e na Colômbia (Vela Coral MC. *et al. Emerging Infectious Diseases* 2001; 7:832-836), mostram resultados similares, com a prevalência de linhagens com PspA pertencente às famílias 1 e 2 em 94% e 97,5% dos isolados, respectivamente. Foi proposto que uma vacina ideal composta por PspA deveria conter um representante da família 1 e um representante da família 2, devido à reatividade cruzada entre membros da mesma família (pedido de patente PI 9908649-2 A2). Assim, tal vacina apresentaria teoricamente uma cobertura para aproximadamente de 90% dos isolados. Entretanto, esta teoria não se sustenta, à medida que novos dados apontam para moléculas que apresentam baixa reatividade cruzada com outras da mesma família. Este fator levou ao estudo da reatividade cruzada de anticorpos

produzidos contra a região N-terminal de PspA dos diferentes clados, utilizando pneumococos de diversos sorotipos isolados no Brasil. Foi demonstrado que moléculas de PspA dos clados 4 e 5 (PspA4 e PspA5) são capazes de induzir anticorpos que reconhecem diferentes PspAs, mesmo quando estes pertencem a famílias diferentes (Darrieux M. *et al. Journal of Medical Microbiology* 2008; 57:273-278). No mesmo estudo, em uma análise da reatividade cruzada de soros de animais previamente imunizados com PspA híbrida composta por fragmentos fundidos de PspA de diferentes famílias, particularmente regiões N-terminais de PspA dos clados 1 e 4, foi demonstrado um forte reconhecimento de isolados contendo clados pertencentes às famílias 1 e 2. Além disso, camundongos imunizados com PspA4 ou PspA5 apresentaram proteção contra desafio intranasal letal com isolados de pneumococo expressando PspA destas duas famílias (Moreno AT. *et al. Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17:439-446). Assim, as proteínas de PspA4 e PspA5, combinadas ou não com PspA1, ou fragmentos das mesmas, parecem ser os antígenos de escolha para uma vacina que apresente ampla cobertura de isolados.

### **Vacina celular pertussis**

*Bordetella pertussis* é uma bactéria que causa uma doença infecciosa do trato respiratório conhecida como

coqueluche, pertussis ou tosse comprida. A vacina celular pertussis (VP) produzida pelo Instituto Butantan é composta pela bactéria *B. pertussis* inativada por tratamento com formalina. Esta vacina é administrada a crianças em  
5 combinação com toxóide diftérico e toxóide tetânico, numa formulação conhecida como tríplice ou DTP, que protege contra difteria, tétano e coqueluche. Após a sua introdução no país, observou-se uma redução rápida e significativa na incidência de casos de coqueluche (de Carvalho AP. &  
10 Pereira EM. *Jornal de Pediatria* 2006;82:S15-S24). Antigamente, a vacina celular pertussis era adotada por diversos países com sucesso, entretanto, alguns efeitos adversos provavelmente relacionados a impurezas derivadas dos métodos de inativação, que varia nos diversos países,  
15 ou à quantidade da endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), levaram à substituição desta por formulações acelulares (Locht C. *Microbes and Infection* 2008;10:1051-1056). No Brasil, não há relatos de efeitos adversos sérios relacionados à vacina celular pertussis produzida pelo  
20 Instituto Butantan, a qual vem sendo administrada em crianças a partir dos dois meses de vida há mais de 20 anos. Vacinas celulares também são adotadas por outros países em desenvolvimento já que as vacinas acelulares apresentam, em geral, menor eficácia e, principalmente,

altos custos de produção (Locht C. *Microbes and Infection* 2008; 10:1051-1056).

Recentemente, o Instituto Butantan desenvolveu uma tecnologia para remoção da maior parte do LPS da VP, produzindo a nova vacina celular pertussis "low" (VP<sub>L</sub>) (pedido de patente PI0402630-6 A). Esta nova vacina foi testada com sucesso em ensaios clínicos de fase 1 e apresentou resultados semelhantes ao da vacina celular convencional VP (Zorzeto TQ. *et al. Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16:544-550).

#### **Vacinas combinadas**

Vacinas combinadas oferecem a vantagem de um menor número de inoculações no paciente, resultando também na diminuição de custos associados à administração dos imunobiológicos. A combinação de uma vacina composta de bactéria inteira inativada com um antígeno protéico de outro organismo patogênico pode potencializar a resposta imune contra este segundo componente através de um efeito adjuvante ou sinérgico.

#### **Combinação de PspA e vacina celular pertussis**

Apesar dos dados da literatura apontarem para o antígeno PspA como um antígeno com grande potencial no desenvolvimento de vacinas contra infecções causadas por pneumococo, todas as abordagens até o momento estão longe

de serem ideais. Fatores como número de doses, via de imunização e adequação das estratégias para uso em crianças recém-nascidas ou com poucos meses de vida são fatores que devem ser considerados para uma proposta de vacina que  
5 apresente eficácia aliada a baixos custos, segurança e abrangência de toda a população.

A combinação dos antígenos com diferentes adjuvantes modula quantitativa e qualitativamente a resposta imune, influenciando decisivamente nos fatores mencionados acima e  
10 no sucesso de uma vacina (Reed SG. *et al. Trends in Immunology* 2008; 30:23-32). Em geral, vacinas compostas por patógenos atenuados ou inativados, como a vacina celular pertussis, apresentam propriedades imunomodulatórias inerentes, dispensando o uso de outros adjuvantes.  
15 Componentes bacterianos como lipopolissacarídeos, ácidos lipoteicóicos, proteínas e ácidos nucleicos são conhecidos ligantes de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a organismos patogênicos. Estes receptores estão presentes nas superfícies e também no  
20 interior das células de hospedeiros e sua ativação exerce efeitos estimulantes sobre sistema imune (Reed SG. *et al. Trends in Immunology* 2008; 30:23-32; Harandi AM. *et al. Expert Reviews of Vaccines* 2009; 8:293-298).

Existem no estado da técnica exemplos de vacinas que

utilizam a propriedade imunomodulatória de adjuvantes celulares em combinação com outros antígenos. Um exemplo disso é a combinação de uma vacina celular pertussis com uma vacina contra a influenza por via nasal, a qual foi  
5 proposta por Berstad AK. et al. *Journal of Medical Microbiology* 2000; 49:157-163. Outro exemplo é uma vacina contra pneumonia pleural em suínos, compreendendo componente celular ou antígenos isolados de *Haemophilus pleuropneumoniae* combinados com o adjuvante *B. pertussis*,  
10 que é descrita na Publicação Internacional nº WO 80/02113, de 16 de outubro de 1980.

#### OBJETIVOS DA INVENÇÃO

Constitui um objetivo da presente invenção, fornecer composições imunogênicas sinérgicas compreendendo ao menos  
15 um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada e ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas e um veículo farmacologicamente aceitável. Constitui outro objetivo da  
20 presente invenção fornecer composições imunogênicas sinérgicas compreendendo ao menos um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada, ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das

mesmas, uma ou mais toxinas diftéricas inativadas e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Constitui outro objetivo da presente invenção fornecer composições imunogênicas sinérgicas compreendendo ao menos  
5 um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada, ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas, uma ou mais toxinas tetânicas inativadas e um veículo farmacêuticamente  
10 aceitável.

Constitui ainda um objetivo da presente invenção o uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, da presente invenção na manufatura de vacinas combinadas para prevenção contra coqueluche, tétano, difteria e/ou  
15 infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

#### DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As figuras a seguir fazem parte do presente relatório e estão aqui incluídas a fim de ilustrar determinados aspectos da invenção. O objeto da presente invenção pode  
20 ser melhor entendido com referência a uma ou mais dessas figuras, em combinação com a descrição detalhada da modalidade preferida aqui apresentada.

A Figura 1 mostra a quantidade de patógeno (pneumococos) recuperados de lavados pulmonares (A) e

sangue (B) de camundongos BALB/c imunizados com VP ou PspA5-VP coletados em diferentes períodos após desafio intranasal com o isolado ATCC6303. Unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas após plaqueamento em 5 ágar-sangue de amostras de 4 animais por grupo. Os triângulos representam amostras individuais de camundongos e as linhas indicam a média de cada grupo (d=dias).

A Figura 2 demonstra a indução de anticorpos anti-PspA5 em camundongos imunizados com diferentes formulações 10 vacinais por via nasal. Três semanas após a última imunização, anticorpos anti-PspA IgG foram detectados no soro (A) através de ELISA. Anticorpos anti-PspA IgG (B) e IgA (C) também foram detectados em amostras de fluido broncoalveolar (BALF). A média da concentração de 15 anticorpos de 6 (A) ou 4 (B e C) animais está indicada. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle ou com o grupo imunizado com PspA5 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.005$ , teste U de Mann-Whitney).

20 A Figura 3 mostra a reatividade cruzada induzida pela imunização com PspA5-VP. Em um lisado total de proteínas de diferentes isolados de pneumococo foram analisados por "imunoblotting" utilizando-se uma diluição 1:500 de soro de camundongos BALB/c imunizados por via nasal com PspA5 (A)

ou PspA5-VP (B).

A Figura 4 mostra a indução de anticorpos anti-PspA5 em camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais por via subcutânea. Três semanas após a  
5 imunização, anticorpos anti-PspA5 IgG foram detectados no soro através de ELISA. A média da concentração de anticorpos de 6 animais por grupo é mostrada. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os  
10 grupos indicados (\*\* $P < 0.005$ , comparação entre camundongos não-imunizados ou com respectivo controle, e \* $P < 0.01$ , comparação entre camundongos imunizados com PspA5, teste U de Mann-Whitney).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

##### 15 **Descrição das composições imunogênicas sinérgicas**

A presente invenção refere-se a composições imunogênicas sinérgicas compreendendo ao menos um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada e ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de  
20 superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* para proteção contra coqueluche e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

As composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção compreendem ao menos um antígeno celular de

*Bordetella pertussis* inativada e ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* e um veículo farmacêuticamente aceitável.

5 Preferencialmente, o antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada compreende baixo teor de lipopolissacarídeos. Isto se deve ao fato do lipopolissacarídeo da parede de bactérias gram-negativas ser uma endotoxina com atividade tóxica, inflamatória e  
10 pirogênica. A sua remoção parcial da *Bordetella pertussis* pode ser feita por extração com solventes e detergentes apropriados, resultando no antígeno celular *Bordetella pertussis* com baixo teor de lipopolissacarídeos (VP<sub>L</sub>).

Preferencialmente, o antígeno protéico é uma  
15 combinação de pelo menos duas PspA, fragmentos combinados das mesmas ou fragmentos fusionados das mesmas selecionadas de clados pertencentes às famílias 1 e 2. Preferivelmente, as PspA ou fragmentos das mesmas são selecionadas dos clados 1, 4 e 5.

20

Preferivelmente, os fragmentos de PspA são selecionados da região N-terminal de  $\alpha$ -hélice até a região rica em resíduos de prolina. , Mais preferivelmente, o fragmento de PspA é selecionado da região rica em resíduos

de prolina.

As composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção podem compreender adicionalmente um ou mais antígenos de toxinas inativadas. Preferivelmente as toxinas inativadas são selecionadas de toxina diftérica inativada e toxina tetânica inativada.

Assim, composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção podem compreender ao menos um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada, ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas, uma ou mais toxinas diftéricas e/ou tetânicas inativadas e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Os componentes inativados das composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção podem ser obtidos por qualquer método conhecido na técnica, tais como procedimentos químicos, como o tratamento com formaldeído ou água oxigenada, ou mesmo técnicas de recombinação de DNA.

De acordo com a presente invenção, "adjuvantes" são moléculas, componentes, macromoléculas ou microorganismos atenuados ou mortos que potencializam a resposta às imunizações, reduzem a quantidade de antígeno necessária e direcionam o tipo de resposta imune a ser desenvolvida,

além de sustentá-la por um período de tempo maior, como um imunógeno, é qualquer material ou substância que altera o tipo, a velocidade, a intensidade ou a duração da resposta imune.

5           As composições da presente invenção podem compreender ainda excipientes, como bactericidas, bacteriostáticos, antioxidantes, conservantes, tampões, estabilizantes, ajustadores de pH, ajustadores de osmolaridade, agentes antiespuma e tensoativos; e resíduos de agentes de  
10 inativação ou fracionamento de antígenos, componentes de meios de crescimento e solventes comumente utilizados na produção de vacinas, exemplos destes tipos de componentes podem ser encontrados no *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases The Pink Book*, 11<sup>a</sup> edição,  
15 seção "Vaccine Excipient & Media Summary" (Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J, McIntyre L, eds. 11th ed. Washington DC: Public Health Foundation, 2009) incorporado aqui como  
20 referência.

Conforme usado na presente invenção, o emprego do termo "farmaceuticamente aceitável" significa um sólido não-tóxico, inerte, excipiente líquido semi-sólido, diluente, formulação auxiliar de qualquer tipo, ou

simplesmente um meio aquoso estéril, tal como solução salina. Alguns exemplos dos materiais que podem servir como veículos farmacêuticamente aceitáveis são açúcares, tais como lactose, glicose e sacarose, os amidos, tais como amido de milho e o amido de batata, a celulose e os seus derivados, tais como a carboximetilcelulose de sódio, a etilcelulose e o acetato de celulose, ciclodextrina; óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de girasol, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de semente de soja; glicóis, tais como propilenoglicol, polióis, tais como glicerínoglicol, sorbitol, manitol e de polietileno; ésteres, tais como o laurato etílico, oleato etílico, ágar; agentes tamponantes, tais como o hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio; ácido algínico; água livre de pirogênio; salina isotônica, solução de Ringer; soluções tampões de álcool etílico e fosfato, assim como outras substâncias não tóxicas compatíveis usadas em formulações farmacêuticas.

Uma variedade de vias de administração das composições imunoterápicas e vacinas descritas na presente invenção está disponível. O modo particular selecionado dependerá do princípio ativo em particular selecionado, a dosagem necessária para eficácia terapêutica e do paciente ao qual será administrada a composição. Os métodos da presente

invenção, geralmente, podem ser praticados usando qualquer modo de administração biologicamente aceitável, i.e. qualquer modalidade que produzir níveis eficazes de resposta imune sem causar efeitos adversos clinicamente indesejáveis. Tais modos de administração incluem as vias oral, retal, sublingual, tópica, nasal, transdermal ou parenteral. O termo "parenteral" inclui subcutânea, intravenosa, epidural, irrigação, intramuscular, bombas de liberação, ou de infusão. Particularmente, nesta invenção as vias parenteral e nasal são preferidas para administração das composições aqui reivindicadas.

Para a administração nasal, os princípios ativos podem ser dissolvidos em um veículo farmacêutico e administrados como uma solução, emulsão, incluindo micro e nanoemulsões, ou suspensão. Exemplos de veículos apropriados são água e solução salina ou suspensões sólidas, como spray, lactose, frutose ou flocos de quitosana. Outros veículos podem também conter outros ingredientes, por exemplo, preservativos, agentes suspensores, agentes solubilizantes, tampões e similares.

Para a administração parenteral, os princípios ativos podem igualmente ser dissolvidos em um veículo farmacêutico e administrados como uma solução, emulsão, incluindo micro e nanoemulsões, ou suspensão. Exemplos de veículos

apropriados são água, salina, soluções de dextrose, soluções de frutose ou óleos de origem animal, vegetal ou sintéticos.

#### **Propriedades das composições imunogênicas sinérgicas**

5 As composições da presente invenção apresentam um efeito sinérgico inesperado sobre a resposta imunológica contra o componente pneumococo. Conforme poderá ser visto nos Exemplos abaixo, observou-se um aumento significativo no nível de anticorpos induzidos contra PspA e na proteção  
10 contra desafio letal com isolados de diferentes cepas de pneumococo. Foi também observado que a combinação da vacina celular pertussis com um antígeno PspA leva a um aumento significativo da resposta imunológica específica contra PspA, induzindo uma resposta protetora mais efetiva e  
15 inesperada, o que reforça a hipótese da existência de uma interação sinérgica entre estes dois componentes.

Adicionalmente, as composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção resultantes da combinação de antígenos proteicos das famílias 1 e 2 ou fragmentos das mesmas  
20 apresentam o efeito técnico inesperado de provocar uma resposta imune cruzada, ou heteróloga, contra cepas de *S. pneumoniae* expressando proteínas de superfície pertencentes a clados e famílias diferentes daquelas presentes na composição. Nos experimentos realizados, uma proteína

pertencente ao clado 5 e uma proteína pertencente ao clado 4, ambos da família 2 das PspA de pneumococos, foram combinadas em uma composição de vacina e esta foi inoculada em camundongos. Verificou-se após 21 dias a produção de anticorpos IgG que reagem com diversas cepas de pneumococos expressando PspA de diferentes clados das famílias 1 e 2.

Adicionalmente, foi demonstrado que as composições imunogênicas da presente invenção promovem proteção contra diferentes cepas de pneumococos expressando diferentes PspA em camundongos quando utilizados por via nasal e que a adição de VP ou VP<sub>L</sub> aumenta significativamente a produção de anticorpos IgA e IgG contra estes micro-organismos.

Além disso, o fato de que a combinação de antígenos PspA e o adjuvante celular de *B. pertussis* pode ser ainda somada à vacina tríplice bacteriana DTP, que já é administrada no Brasil em crianças (aos 2, 4 e 6 meses, com um reforço aos 15 meses e outro entre 4 e 6 anos), permite a imunização contra infecções pneumocócicas na faixa mais susceptível da população.

#### 20 **Uso das Composições Imunogênicas Sinérgicas**

Considerando as propriedades das composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção, constitui outro aspecto da presente invenção o uso das composições imunogênicas sinérgicas para a prevenção de infecções

causadas por *S. pneumoniae* e *B. pertussis* em humanos.

Constitui outro aspecto da presente invenção o uso da combinação do antígeno adjuvante de *B. pertussis* inativada e antígeno proteico PspA com toxóides diftérico e/ou  
5 tetânico para a prevenção de infecções causadas por *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, tétano e/ou difteria em animais ou humanos.

Constitui um outro aspecto da presente invenção o uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da  
10 presente invenção na manufatura de uma vacina combinada para prevenção contra coqueluche e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

Constitui outro aspecto da presente invenção o uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente  
15 invenção na manufatura de uma vacina combinada para prevenção contra coqueluche, difteria e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

Constitui outro aspecto da presente invenção o uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente  
20 invenção na manufatura de uma vacina combinada para prevenção contra coqueluche, tétano e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

Constitui outro aspecto da presente invenção o uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente

invenção na manufatura de uma vacina combinada para prevenção contra coqueluche, tétano, difteria e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

#### EXEMPLOS

5 Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos são agora apresentados como exemplos os resultados dos diferentes ensaios efetuados com relação a esta invenção.

10 No Exemplo 1 é descrita a obtenção do antígeno PspA e são definidas as vacinas celulares pertussis utilizadas. No Exemplo 2 são descritas as propriedades e o uso das combinações vacinais.

**Exemplo 1: Obtenção do antígeno PspA e preparação das**  
15 **composições imunogênicas.**

**a) Construção dos vetores para expressão de PspA.** As sequências codificadoras da região N-terminal até a região rica em prolina de PspA madura do clado 1 (PspA1), clado 4 (PspA4Pro) e do clado 5 (PspA5) foram amplificadas através  
20 de reação de polimerização em cadeia (PCR) a partir do DNA genômico dos isolados de *S. pneumoniae* St 435/96, St 255/00 e St 122/02 (*pspA* clado 1, 4 e 5), respectivamente. A amplificação foi realizada utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do

fabricante e nas seguintes condições de temperatura: 94°C - 4 minutos / 94°C - 1 minuto / 60°C - 1 minuto / 72°C - 2 minutos / 72°C - 10 minutos / 4°C, realizando 30 ciclos de amplificação. Foram utilizados os seguintes pares de oligonucleotídeos: pspA1 (SEQ. ID. No. 1), pspA4pro (SEQ. ID. No. 2) e pspA5 (SEQ. ID. No. 3).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o Kit "GFX DNA and Gel Purification" (GE-Healthcare). Estes fragmentos purificados foram utilizados na reação de ligação no vetor pGEM-T-Easy (Promega). As reações de ligação foram mantidas a 4°C durante 16 horas e utilizadas para transformar *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio 2YT-amp (Tryptona 1,6% (m/V), extrato de levedura 1% (m/V), NaCl 0,5% (m/V) e 100  $\mu$ g/mL de ampicilina) contendo X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo 0,008%) para seleção de colônias brancas e azuis. As extrações de DNA plasmidial das colônias transformadas foram realizadas com o kit de minipreparações GFX (GE-Healthcare). A presença do inserto foi confirmada por análise de restrição e a sequência determinada em sequenciador automático ABI Prism 3100 (PE Applied Biosystem). Essas amostras digeridas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% e

as bandas de tamanho correspondente ao esperado, contendo o inserto, foram cortadas e purificadas. Esses insertos foram ligados no vetor de expressão em *E. coli* pAE, que permite a expressão da proteína recombinante em fusão com 6 resíduos de histidina na porção N-terminal, possibilitando sua purificação em coluna quelante de níquel (Ramos CR. et al. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004; 37:1103-1109). *E. coli* DH5 $\alpha$  foi transformada com o produto dessa ligação e os plasmídeos foram isolados por minipreparações, originando os vetores pAE-*pspA1*, pAE-*pspA4Pro* e pAE-*pspA5*. As sequências de *pspA1*, *pspA4* e *pspA5* encontram-se depositadas no GenBank com os números de acesso AY082387, EF649969 e EF649970, respectivamente (Darrieux M. et al. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57:273-278). O fragmento original *pspA4* codifica uma proteína que contém dois blocos de repetições de prolinas separados por uma região sem prolinas em sua região C-terminal, enquanto que *pspA4Pro* possui nesta mesma região apenas o primeiro bloco de repetição de prolinas (Moreno AT. et al. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17:439-446).

**b) Expressão e purificação de PspA.** *E.coli* BL21 (SI) competentes (Invitrogen) foram transformadas com os vetores construídos pAE-*pspA1*, pAE-*pspA4Pro* e pAE-*pspA5* e crescidas

a 30°C durante 16 horas. A expressão da T7 polimerase nesta linhagem encontra-se sob o controle do promotor induzível por choque osmótico pro-U, enquanto que a expressão do gene clonado em pAE está sob controle do promotor T7. Clones

5 isolados foram inoculados em 5 mL de meio 2YT/ON-amp (Tryptona 1,6% (m/V) e extrato de levedura 1% (m/V) e 100 µg/mL de ampicilina) e crescidas a 30°C durante 16 horas. Esses inóculos foram diluídos na proporção de 1:30 nesse mesmo meio em um volume final de 300 ml. A expressão das

10 proteínas foi induzida através da adição de NaCl (300 mM) e cultivo por 3 horas. As células foram centrifugadas a 3200 g durante 15 minutos, ressuspendidas em 30 ml de tampão de equilíbrio (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 5 mM Imidazol) e lisadas no aparelho French Press (1500 psi). As células

15 lisadas foram centrifugadas a 12900 g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e filtrado. A purificação a partir da fração solúvel foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel, com auxílio do aparelho Äkta Prime (GE Healthcare). Após a lise celular, o sobrenadante foi

20 adsorvido à coluna previamente carregada com 300 mM de NiSO<sub>4</sub> e equilibrada com 20 mL do tampão de equilíbrio. Lavagens foram realizadas com 50 mL do tampão de lavagem (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 50 mM Imidazol) e as

proteínas foram recuperadas com o tampão de eluição (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 250 mM Imidazol). Após a cromatografia, as frações coletadas foram separadas e analisadas em gel de poliacrilamida-SDS 12% e em seguida dialisadas utilizando-se solução tampão de diálise (10 mM Tris pH 8, 20 mM NaCl, 0,1% glicina). Essa solução foi deixada sob agitação constante por 16 horas a 4°C. A dosagem das proteínas recombinantes foi determinada pelo método de Bradford (Protein Assay Kit - Biorad) utilizando albumina bovina sérica como padrão. As proteínas foram estocadas a -20°C.

**c) Preparação das composições imunogênicas.** Para a preparação das composições imunogênicas e da vacina pertussis VP, uma cepa liofilizada de *B. pertussis* 137 foi ressuspensa em solução salina 0,9%, semeada em tubos de meio Bordet-Gengou e incubada a 35°C durante 72 horas. Os cultivos celulares foram amplificados através de transferência para outros tubos contendo meio Bordet-Gengou e incubados a 35°C por mais 24 horas. Os cultivos celulares foram então inoculados em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio Stainer-Scholte modificado e mantidos a 35°C com agitação a 150 rpm. Após 24 horas, o cultivo em meio líquido foi inoculado em pré-fermentador com capacidade de 150 L contendo 60 L de meio de cultura. Após 20 horas a

35°C, 40 L de cultivo foram transferidos para fermentador com capacidade de 750 L contendo 400 L de meio ou 60 L de cultivo foram transferidos para fermentador com capacidade de 1000 L contendo 600 L de meio. Após 20 horas, o cultivo  
5 foi submetido a filtração tangencial (0,22 µm) para obtenção da biomassa bacteriana que foi então destoxificada com formol 0,2%. As células de *B. pertussis* destoxificadas foram centrifugadas a 8000 rpm durante 1 hora a 4°C ou concentradas por filtração tangencial. Para a produção da  
10 vacina pertussis low (VPL), o concentrado bacteriano foi mantido durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação na presença de solvente orgânico (20 mL de solvente a 9% para 1 g de massa úmida bacteriana). A suspensão foi centrifugada a 800 rpm durante 1 hora a 4°C ou concentrada  
15 por filtração tangencial. O precipitado final foi lavado com solução salina 0,9% (1g de precipitado em 10 mL de salina), seguido de nova centrifugação ou filtração tangencial. O precipitado final foi ressuspensão em solução salina tamponada com fosfato (pH 6,8). Estes processos  
20 encontram-se descritos no pedido de patente do processo de obtenção de nova vacina celular pertussis (Pedido de Patente PI 0402630-6). A composição imunogênica da vacina dupla DT é composta de toxóide diftérico e toxóide tetânico. A composição imunogênica da vacina tríplice DTP

contém o componente VP. A composição imunogênica da vacina tríplice DTP<sub>L</sub> contém o componente pertussis VP<sub>L</sub>. As três composições imunogênicas de vacinas utilizam hidróxido de alumínio como adjuvante.

5        Para a preparação do componente toxoide tetânico presente nas composições imunogênicas de vacinas DT, DTP e DTP<sub>L</sub>, a cepa liofilizada de *Clostridium tetani* Harvard-Caracas foi ressuspensa em meio de Tioglicolato Fluído. Foram feitas duas passagens neste mesmo meio as quais foram  
10 incubadas durante 40 horas e 24 horas respectivamente, a 37°C. A cultura da segunda passagem foi transferida para frasco contendo meio de Tioglicolato Fluído e incubada a 37°C por 8 horas. O cultivo em frasco foi utilizado como inóculo de produção para o fermentador. O meio de cultura  
15 IB para produção de Toxina Tetânica foi preparado, esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm. Na seqüência, o Inóculo de Produção foi introduzido assepticamente no fermentador. O processo fermentativo é de 88 horas ± 1h à 36°C ± 1°C. A seguir o cultivo foi  
20 submetido à filtração tangencial em membranas de 0,22 µm para separação da biomassa e do filtrado tóxico que contém a Toxina Tetânica, que é recolhida em recipiente de 300 litros. A Toxina Tetânica foi concentrada através do

sistema de ultrafiltração molecular em corte de 30 kDa. A seguir, adicionou-se uma solução de Formaldeído p.a. a 37% na proporção de 1%, Glicina (1g para cada 1,2 mL de formaldeído) e Bicarbonato de sódio 0,5%. A Toxina Tetânica concentrada foi submetida à filtração esterilizante em 5 membranas de 0,22  $\mu\text{m}$ . O produto filtrado estéril foi incubado à temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 30 dias. Após este período de destoxificação uma amostra foi retirada para os testes biológicos (para comprovar a perda da 10 toxicidade) e para os testes microbiológicos e físico-químicos. Após a liberação nos testes de controle de qualidade, o produto foi purificado através de cromatografia em gel filtração (sephacril S-200). A seguir foi adicionado timerosal como conservante e o produto foi 15 submetido a filtração esterilizante. Após a aprovação dos testes de controle de qualidade o produto é utilizado na produção de Vacina Dupla para uso infantil (DT), Vacina Dupla para uso adulto (dT) e Vacina Tríplice (DTP ou DTP<sub>L</sub>).

Para a preparação do componente toxoide diftérico 20 presente nas composições imunogênicas das vacinas DT, DTP e DTP<sub>L</sub>, a cepa liofilizada de *Corynebacterium diphtheriae* Park-Williams 8 foi reconstituída em meio IB para produção de toxina diftérica e semeada em meio de Loeffler. Após 24

horas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , o cultivo foi transferido para erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio IB para produção de toxina diftérica, previamente adicionado de solução de cloreto de cálcio a 40%. Os erlenmeyers foram mantidos durante 24 horas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , com agitação a 150 rpm. Foram realizadas mais duas transferências sob as mesmas condições. O terceiro cultivo foi utilizado como Inóculo de Produção para o fermentador.

O meio de cultura IB para produção de toxina diftérica foi preparado, esterilizado por filtração em membranas de  $0,22\ \mu\text{m}$  e adicionado de solução de cloreto de cálcio a 40%. Na seqüência, o Inóculo de Produção foi introduzido assepticamente no fermentador. O processo fermentativo foi de 64 horas  $\pm 1\text{h}$  à  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A seguir o cultivo foi submetido à filtração tangencial em membranas de  $0,22\ \mu\text{m}$  para separação da biomassa e do filtrado tóxico que contém a Toxina Diftérica, que é recolhida em recipiente de 300 litros. A Toxina Diftérica foi concentrada através do sistema de ultrafiltração molecular em corte de 30 kDa. A seguir, adicionou-se uma solução de Formaldeído p.a. a 37% na proporção de 0,7%, solução de L-lisina 2 M e Bicarbonato de sódio 0,5%. A Toxina Diftérica Concentrada foi submetida à filtração esterilizante em membranas de  $0,22\ \mu\text{m}$ . O

produto filtrado estéril foi incubado à temperatura de 36°C ± 1°C durante 30 dias. Após este período de destoxificação uma amostra foi retirada para os testes biológicos (para comprovar a perda da toxicidade) e para os testes 5 microbiológicos e físico-químicos. Após a liberação nos testes de controle de qualidade, o produto foi purificado através de precipitação com sulfato de amônio e posteriormente diafiltrado e concentrado no sistema de filtração tangencial em corte de 30 kDa. A seguir foi 10 adicionado timerosal como conservante e o produto foi submetido a filtração esterilizante. Após a aprovação dos testes de controle de qualidade o produto foi utilizado para a produção de Vacina Dupla para uso infantil (DT), Vacina Dupla para uso adulto (dT) e Vacina Tríplice (DTP ou 15 DTP<sub>L</sub>).

**Exemplo 2: Propriedades das composições imunogênicas: aumento de reatividade e proteção cruzada contra pneumococo através do uso da combinação de PspA com as vacinas celulares pertussis.**

20 **a) Imunização de camundongos e desafio intranasal letal.** Camundongos BALB/c foram imunizados com 5 µg de PspA4Pro ou PspA5 somente ou em combinação com 1/8 da dose humana de VP ou VP<sub>L</sub>. Antes da formulação das composições, LPS residual proveniente de *E. coli* foi removido das

preparações proteicas através de extração com Triton X-114 (Aida Y. & Pabst MJ. *Journal of Immunological Methods* 1990; 132:191-195). A administração nasal foi realizada em animais previamente anestesiados por via intraperitoneal com 200 µL de uma mistura de 0,2% de cloridrato de xilazina (Syntec) e 0,5% de cloridrato de quetamina (Syntec). As vacinas foram administradas em um volume de 10 µL nos dias 0, 3, 14, 17, 28 e 31 (total de 6 doses). Nos experimentos de imunização subcutânea, os animais receberam uma dose da vacina composta de 5 µg de PspA4Pro ou PspA5 combinados com 1/8 da dose humana da vacina dupla DT ou vacina tríplice DTP<sub>L</sub> em volume de 100 µL. Os camundongos foram sangrados por punção retroorbital e o soro coletado 21 dias após a última imunização. Também foram coletadas amostras de fluido broncoalveolar (BALF). Os animais foram sacrificados através da injeção de uma dose letal de uretano (15 mg por 10 g de peso corporal) e foram realizadas duas lavagens com 0,5 e 1 mL de PBS através do uso de um cateter inserido na traquéia. O fluido coletado foi aliquoteado e mantido a -80°C. A presença de anticorpos anti-PspA no soro e BALF foi avaliada através de imunoensaio (ELISA - "Enzymatic-linked immunoassay"). Placas de 96 poços com fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram revestidas com solução de proteínas recombinantes (1 µg/mL) em tampão Carbonato-Bicarbonato (50

mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 50 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6) e mantidas a 4 °C por 16 horas. Em seguida, as placas foram mantidas a 37 °C por 30 minutos e lavadas três vezes com PBS-T (1,37 mol/L NaCl, 27 mmol/L KCl, 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 14 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 e 0,05% Tween 20). Os bloqueios foram feitos com em PBS-SFB (PBS contendo 10% de soro fetal bovino) a 37°C por 30 minutos. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Diluições seriadas do soro dos camundongos imunizados ou controles foram adicionados em PBS-SFB, seguindo-se de uma incubação a 37 °C por 1 hora e mais três lavagens com PBS-T. A seguir, anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Southern Biotech) em PBS-SFB foi adicionado nas placas seguindo-se de uma incubação a 37 °C durante 1 hora. Após essa incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Os anticorpos foram detectados através da adição da solução substrato para revelação. As reações foram interrompidas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em uma concentração final de 1,25 M e a absorbância a 492 nm ( $A_{492 \text{ nm}}$ ) foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems). Uma curva padrão foi gerada utilizando-se IgG de camundongo (Southern Biotech) para sensibilização das placas. A análise estatística da diferença entre as concentrações de anticorpos foi avaliada pelo teste *U* de Mann-Whitney.

Para os experimentos de "imunoblotting" foram

utilizados o isolado 0603 (sorotipo 6B, PspA de clado 1), o isolado D39 (sorotipo 2, PspA de clado 2), o isolado P2139 (sorotipo 6A, PspA de clado 2), o isolado TIGR4 (sorotipo 4, PspA de clado 3) e o isolado ATCC6303 (sorotipo 3, PspA de clado 5). As bactérias foram cultivadas em placas de ágar sangue e posteriormente em meio líquido THY (meio Todd-Hewitt contendo 0,5% de extrato de levedura - Difco) até a  $DO_{600\text{ nm}}$  0,6. As células foram centrifugadas e os precipitados foram ressuspensos em tampão de lise - DOC (0,1% desoxicolato de sódio, 0,01 dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,15 M citrato de sódio), e incubadas a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e congelado a -20 °C. As proteínas foram separadas em eletroforese em gel 15 poliacrilamida-SDS 10% (15 µg de proteína foram aplicados no gel). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas em solução de PBS-T com 5% leite desnatado por 16 horas a 4 °C. As membranas foram incubadas durante 2 horas com soros contendo anticorpos anti-PspA 20 (1/500) em tampão PBS-T contendo 5% leite desnatado. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS-T. Para a imuno detecção, foi realizada uma incubação de 1 hora com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição (1/1000) e a

detecção foi feita com o kit quimioluminescente ECL (GE-Heathcare).

Foi realizado um desafio intranasal invasivo em camundongos previamente imunizados. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 200  $\mu$ L de uma mistura de 0,2% de cloridrato de xilazina e 1,0% de cloridrato de quetamina. Foram utilizados os isolados A66.1 (sorotipo 3, PspA de clado 2) e ATCC6303 (sorotipo 3, PspA de clado 5). Os isolados foram cultivados até a metade da fase logarítmica de crescimento ( $DO_{600nm}=0.4$ ) em THY e as alíquotas foram congeladas a  $-80^{\circ}C$ . Os animais foram então desafiados através da inoculação de  $1 \times 10^6$  UFC do isolado A66.1 ou  $3 \times 10^5$  UFC do isolado ATCC6303 em 50  $\mu$ L de salina em uma das narinas, com o auxílio de uma micropipeta. Nos experimentos de proteção passiva, o soro dos animais imunizados foi inativado a  $56^{\circ}C$  por 30 minutos. Grupos de 6 camundongos BALB/c não-imunizados foram inoculados com 500  $\mu$ l de uma diluição 1:100 de cada soro por via intraperitoneal, 2 horas antes do desafio com o isolado ATCC6303. A sobrevivência dos animais foi observada durante 10 dias e a diferença na sobrevivência entre os grupos experimentais foi avaliada pelo Teste Exato de Fisher. Foi avaliada ainda a quantidade de bactérias no sangue e nos pulmões dos animais em diferentes tempos após o desafio. O

tecido pulmonar foi rompido em 1 mL de solução salina 0,45% (1/2 salina) através do uso de uma malha de nylon ("cell strainer"). Diluições seriadas do sangue e do homogenato dos pulmões foram plaqueadas em ágar-sangue e incubadas por 5 18 horas a 37°C para determinação de UFC (unidade formadora de colônia). A detecção de 0 UFC foi considerada como 1 UFC. O limite mínimo de detecção foi de 100 UFC/ml para amostras de sangue e 5 UFC/animal para amostras de pulmão.

**b) Proteção induzida através de imunização nasal com**  
10 **uma composição imunogênica compreendendo PspA e vacina**  
**celular pertussis.** Camundongos BALB/c foram imunizados por via nasal com PspA5 somente ou com a combinação com VP (PspA5-VP) e então submetidos a um desafio intranasal letal com o isolado ATCC6303 (PspA de clado 5). Neste modelo,  
15 animais não-imunizados morrem 72 horas após o desafio (Ferreira DM. et al. *Microbial Pathogenesis* 2009;47:157-163). Na Tabela 1, podemos observar que houve proteção significativa no grupo de animais que recebeu a formulação PspA5-VP, enquanto que houve apenas 50% de sobrevivência  
20 nos camundongos imunizados com PspA5 somente. Não foi observada proteção em animais inoculados apenas com VP.

**Tabela 1.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após desafio intranasal com *S. pneumoniae* ATCC6303 - propriedade adjuvante de VP

	vivos/ total	%sobreviventes	P*
Não imunizados	0/6	--	
VP	1/6	16,6	1
PspA5	3/6	50	0,09
PspA5-VP	6/6	100	0,01

\*Teste Exato de Fisher. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Foi avaliada a presença de pneumococos em homogenatos de pulmão e no soro dos animais imunizados com VP ou PspA5-VP em diferentes períodos após o desafio. Como observado na Figura 1A, grande quantidade de bactérias foi recuperada 72 horas após o desafio nos pulmões de animais inoculados com VP. Houve uma diminuição na quantidade de pneumococos recuperados dos pulmões de camundongos imunizados com PspA5-VP em tempos crescentes, resultando no desaparecimento quase que completo das bactérias 21 dias após o desafio. Além disso, não foi possível detectar pneumococos no sangue de animais inoculados com PspA5-VP, enquanto que camundongos imunizados com VP somente apresentaram grande quantidade de bactérias no sangue já em 24 horas após o desafio (Figura 1B).

Uma vez que foi demonstrado em ensaio clínico que a

nova vacina VP<sub>L</sub> com menor conteúdo de LPS induz resposta imunológica contra pertussis semelhante à vacina VP convencional (Zorzeto TQ. *et al. Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16:544-550), foram realizados experimentos de imunização com a combinação de PspA5 com VP<sub>L</sub> e desafio intranasal com o isolado ATCC6303. Como observado na Tabela 2, houve proteção significativa contra infecção com pneumococo somente no grupo imunizado com PspA5-VP<sub>L</sub>. Novamente, a inoculação de PspA5 somente induziu proteção parcial, com 50% de sobrevivência.

**Tabela 2.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após desafio intranasal com *S. pneumoniae* ATCC6303 - propriedade adjuvante de VP<sub>L</sub>.

	vivos/ total	%sobreviventes	P*
Não-imunizados	0/6	---	---
VP <sub>L</sub>	0/5	---	1
PspA5	3/6	50	0,09
PspA5-VP <sub>L</sub>	5/6	83,3	0,007

\*Teste Exato de Fisher. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Ao avaliar a indução de anticorpos específicos, observou-se que a imunização nasal tanto com a formulação PspA5-VP quanto com PspA-VP<sub>L</sub> foi capaz de induzir níveis

bastante altos de anticorpos anti-PspA5 no soro de camundongos. A concentração de anticorpos específicos foi significativamente maior nos grupos imunizados do que nos grupos controle ( $P < 0,05$  na comparação dos grupos controle com PspA5, e  $P < 0,005$  na comparação dos grupos controle com PspA5-VP ou PspA5-VP<sub>L</sub>). Diferenças significativas também foram observadas na comparação do soro de animais imunizados com PspA5-VP ou PspA5-VP<sub>L</sub> com o grupo PspA5 ( $P < 0,05$ ) (Figura 2A). Além disso, tanto a formulação PspA5-VP quanto PspA5-VP<sub>L</sub> foram capazes de induzir altos níveis de anticorpos IgG e IgA anti-PspA em amostras de BALF (Figura 2B e 2C).

Foi demonstrado que soro produzido contra PspA5 apresenta reatividade cruzada com PspA de diferentes clados e famílias (Darrieux M. et al. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57:273-278; Moreno AT. et al. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17:439-446). Ao avaliarmos um painel de isolados utilizados comumente em modelos de desafio de camundongos com pneumococo, foi possível confirmar que soro de animais imunizados por via nasal com PspA5 é capaz de reconhecer extrato total de diferentes isolados em experimento de "imunoblotting" (Figura 3A). No entanto, o soro de camundongos imunizados com a formulação PspA5-VP apresenta uma reatividade cruzada ainda maior, em

consequência dos altos níveis de anticorpos anti-PspA5 induzidos pela vacina combinada (Figura 3B).

**c) Proteção cruzada induzida através da inoculação parenteral das composições imunogênicas compreendendo PspA**

5 **e DTP<sub>L</sub>**. Como os experimentos anteriores indicaram que a combinação de PspA com uma vacina celular pertussis é capaz de induzir proteção contra infecções causadas por pneumococo, foi testada a possibilidade de utilizar por via subcutânea a combinação de PspA5 com a vacina DTP<sub>L</sub> em  
10 camundongos. Após uma única imunização com 5 µg de PspA somente ou em combinação com DT ou DTP<sub>L</sub>, foram detectados altos níveis de anticorpos (Figura 4) ( $P=0,002$  na comparação de PspA5, PspA5-DT ou PspA5-DTP<sub>L</sub> com animais não-imunizados, e  $P=0,002$  na comparação de PspA5-DT ou  
15 PspA5-DTP<sub>L</sub> com DT ou DTP<sub>L</sub>, respectivamente). A formulação PspA5-DTP<sub>L</sub> também induziu níveis mais altos de anticorpos quando comparado ao grupo imunizado com PspA5 somente ( $P=0,008$ ). Além disso, foi observada sobrevivência de 100% dos animais imunizados com uma dose de PspA5-DTP<sub>L</sub> após  
20 desafio com ATCC6303 ( $P=0,001$ , comparação com os grupos controle). Proteção significativa também foi observada com a formulação PspA5-DT, com 66% de sobrevivência ( $P=0,03$ , comparação com grupo controle), conforme demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após desafio intranasal invasivo com *S. pneumoniae* A66.1 e ATCC6303 após imunização subcutânea com PspA5

	ATCC6303 (sorotipo 3, PspA5)			A66.1 (sorotipo 3, PspA2)		
	vivos / total	% sobreviven- tes	$P^*$	vivos / total	% sobreviven tes	$P^*$
Não- imuniza dos	0/6	---	---	0/5	---	---
DT	0/6	---	---	0/6	---	---
DTP <sub>L</sub>	0/6	---	---	0/6	---	---
PspA5	2/6	33,3	0,22	0/6	---	---
PspA5+D T	4/6	66,6	0,03	3/6	50	0,09
PspA5+D TP <sub>L</sub>	6/6	100	0,001	4/6	66.6	0,03

\*Teste Exato de Fisher

Ao realizarmos um desafio com o isolado A66.1, foi observada proteção significativa apenas no grupo imunizado com a formulação PspA5-DTP<sub>L</sub> ( $P=0,03$ , comparação com grupo controle) (Tabela 3). Foi observada, portanto, proteção heteróloga, já que PspA5 pertence à família 2 e a bactéria A66.1 expressa PspA de clado 2, pertencente à família 1. É importante ressaltar que a sobrevivência de 66% dos animais após desafio com esse isolado foi obtida após uma única imunização subcutânea com PspA5-DTP<sub>L</sub> e que maiores níveis de proteção podem ser obtidos através da administração de doses de reforço.

PspA4Pro é o outro fragmento de PspA que havia mostrado capacidade de induzir anticorpos com alta reatividade cruzada com diferentes isolados de pneumococo (Darrieux M. *et al. Journal of Medical Microbiology* 2008; 57:273-278; Moreno AT. *et al. Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17:439-446). Assim, foi testada também a imunização com uma dose por via subcutânea de PspA4Pro somente ou em combinação com DTP<sub>L</sub>. Pode-se observar na Tabela 4, que apenas os grupos imunizados com PspA4Pro-DTP<sub>L</sub> apresentaram proteção significativa ( $P=0,05$ , comparação com grupo controle).

**Tabela 4.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após

desafio intranasal invasivo com *S. pneumoniae* A66.1 e ATCC6303 após imunização subcutânea com PspA4Pro

	ATCC6303 (sorotipo 3, PspA5)			A66.1 (sorotipo 3, PspA2)		
	vivos / total	% sobreviven tes	$P^*$	vivos / total	% sobreviventes	$P^*$
Não- imuniza dos	1/6	---	---	0/5	---	---
DTP <sub>L</sub>	0/6	---	---	0/6	---	---
PspA4P ro	0/6	---	---	0/6	---	---
PspA4P ro+DTP <sub>L</sub>	5/6	83,3	0,05	4/6	66,6	0,05

\*Teste Exato de Fisher

Como PspA4Pro pertence à família 2, foi observada 5 novamente proteção homóloga com uma bactéria que expressa PspA de família 2 (ATCC6303) e proteção heteróloga com uma bactéria que expressa PspA de família 1 (A66.1). Assim como

observado para PspA5-DTP<sub>L</sub>, a sobrevivência de 66% dos animais foi obtida após uma única imunização com PspA4Pro-DTP<sub>L</sub> e maiores níveis de proteção são esperados após a administração de doses de reforço.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> FUNDAÇÃO BUTANTAN

<120> COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS SINÉRGICAS BASEADAS EM ANTÍGENOS  
 PROTÉICOS COMBINADOS COM ANTÍGENO CELULAR PERTUSSIS E TOXINAS  
 INATIVADAS

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 56

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

tagctcgagg aagaagcgcc cgtagctagt tatctagatt ttggtgcagg agctgg 56

<210> 2

<211> 61

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

tagctcgaga ccatggtaag agcagaagaa gccggtacct tatggttttg gtgctggagc 60

t 61

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

tagctcgaga ccatggtaag agcagaagaa gcctagttat ctagattttg gtgcaggagc 60

tgg 63

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica sinérgica **caracterizada pelo** fato de compreender ao menos um antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada e ao menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas e um veículo farmacêuticamente aceitável.  
5
2. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o antígeno celular de *Bordetella pertussis* é a bactéria *Bordetella pertussis* inativada compreendendo baixo teor de lipopolissacarídeos.  
10
3. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizada pelo** fato de que as Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas compreendem uma mistura de pelo menos dois clados de Proteínas de Superfície A.  
15
4. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada pelo** fato de que as Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas são selecionadas de clados pertencentes às famílias 1 e 2.  
20
5. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada pelo** fato de que as

Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas são selecionados dos clados 1, 4 e 5.

6. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que as

5 Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas pertencem ao clado 1.

7. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que as Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* ou

10 fragmentos das mesmas pertencem ao clado 4.

8. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que as Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas pertencem ao clado 5.

15 9. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizada pelo** fato de que os fragmentos de Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* são selecionados do grupo que consiste de: região N-terminal de  $\alpha$ -hélice e região rica em  
20 resíduos de prolina.

10. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 1 a 8, **caracterizada pelo** fato de que o fragmento de Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* compreende a região N-terminal.

11. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizada pelo** fato de que o antígeno protéico compreende dois ou mais fragmentos de Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* podendo ser fundidos, formando uma proteína híbrida.
12. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada pelo** fato de que os fragmentos de Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* fundidos pertencem aos clados 1, 4 ou 5.
13. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada pelo** fato de que a mistura de Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmentos das mesmas conferem proteção heteróloga contra antígenos de outros clados de Proteínas de Superfície A de *Streptococcus pneumoniae* não presentes na mistura.
14. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizada pelo** fato de compreender adicionalmente um ou mais antígenos de toxinas inativadas.
15. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada pelo** fato do antígeno ser selecionado do grupo que consiste de: toxina diftérica

inativada e toxina tetânica inativada.

16. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada pelo** fato do antígeno ser de toxina diftérica inativada.

5 17. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada pelo** fato do antígeno ser de toxina tetânica inativada.

18. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **caracterizada pelo**  
10 fato de ser para administração nasal.

19. Composição imunogênica sinérgica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **caracterizada pelo** fato de ser para administração parenteral.

20. Uso de uma ou mais composições imunogênicas  
15 sinérgicas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizado pelo** fato de ser na manufatura de uma vacina combinada para prevenção contra coqueluche e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

20 21. Uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 16 ou 18 a 19, **caracterizado pelo** fato de ser na manufatura de uma vacina combinada para prevenção contra coqueluche, difteria e infecções causadas por

*Streptococcus pneumoniae*.

22. Uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 15 ou 17 a 19, **caracterizado pelo** fato

5 de ser na manufatura de uma vacina combinada para prevenção contra coqueluche, tétano e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

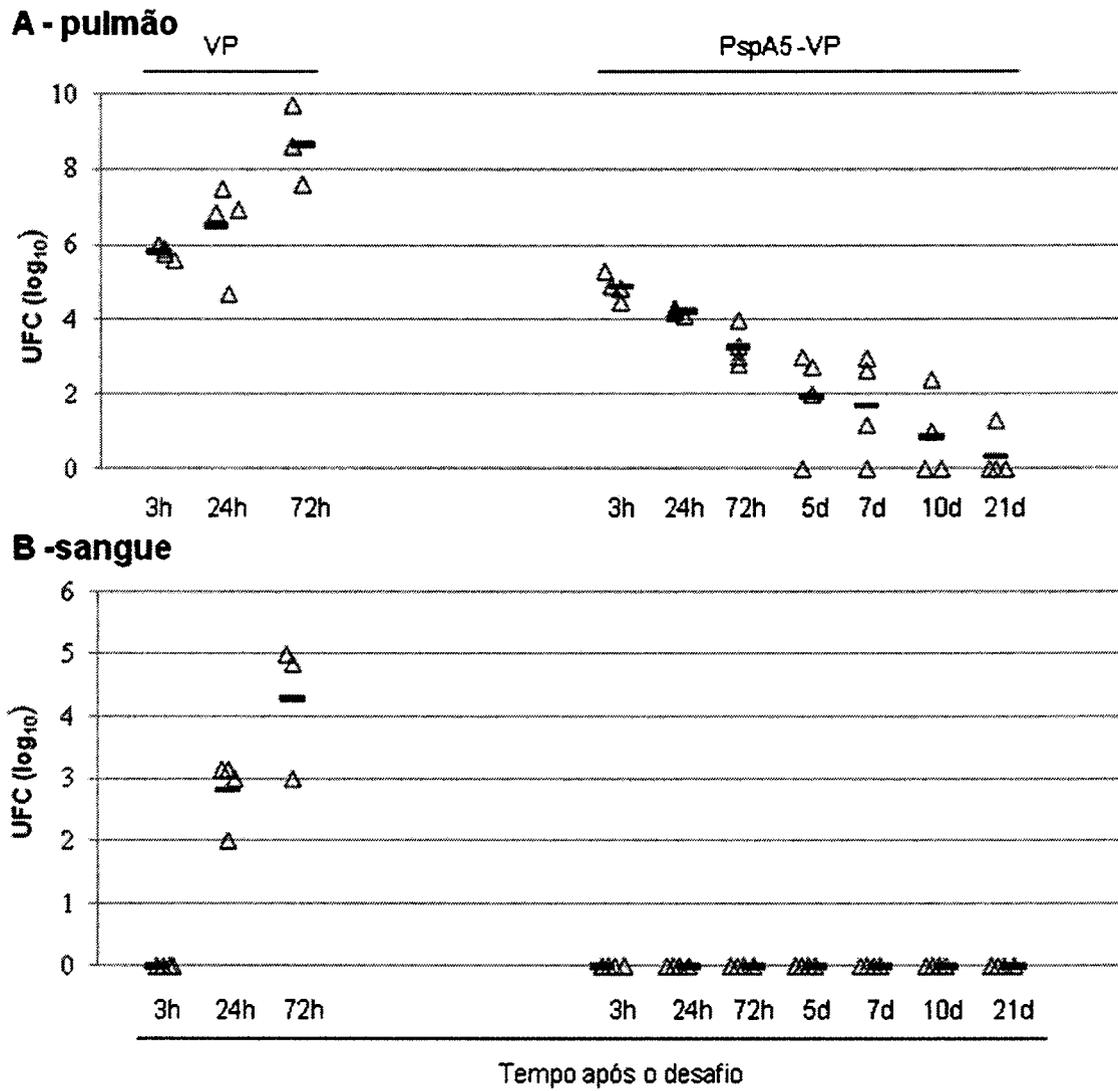


FIGURA 1

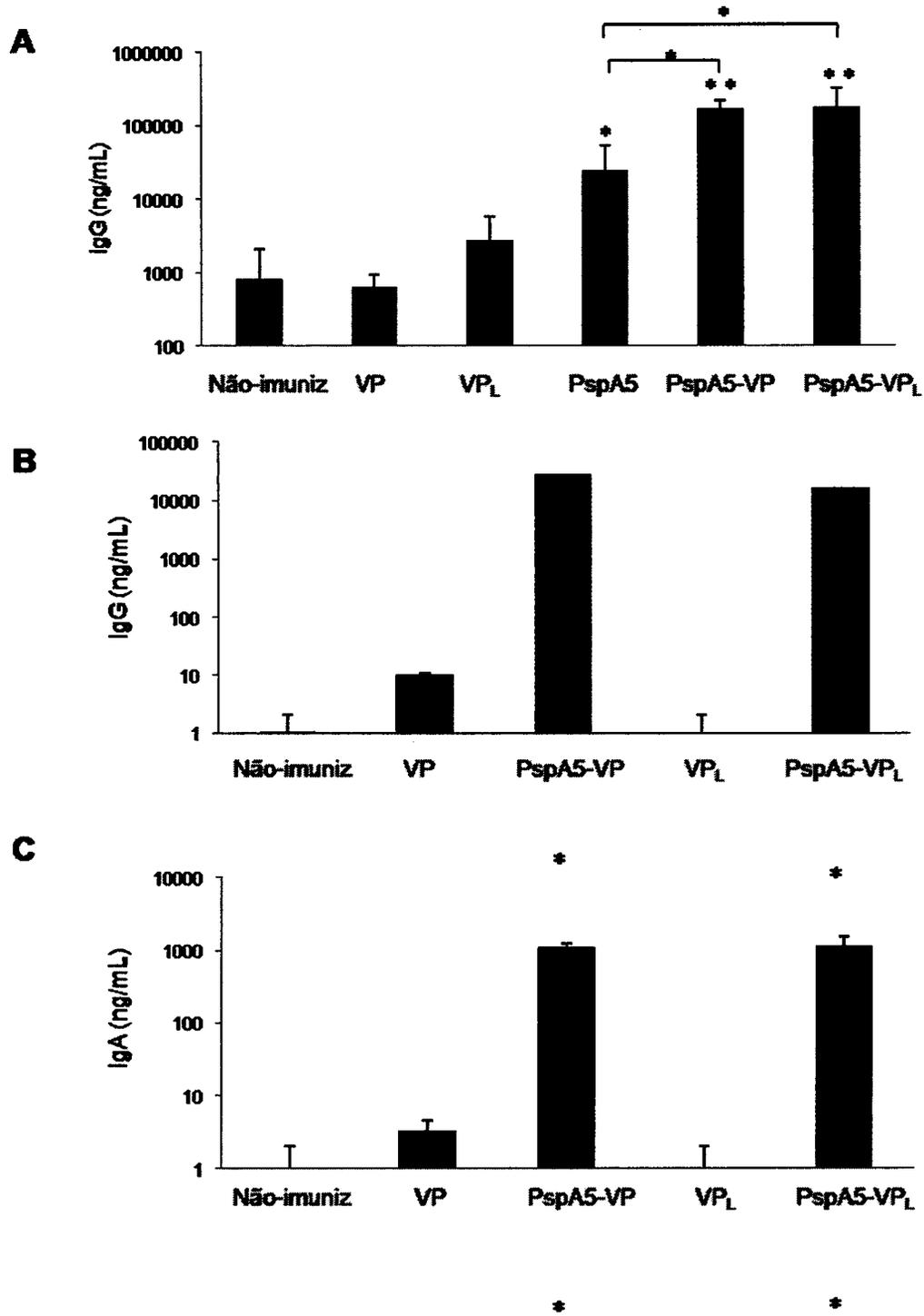


FIGURA 2

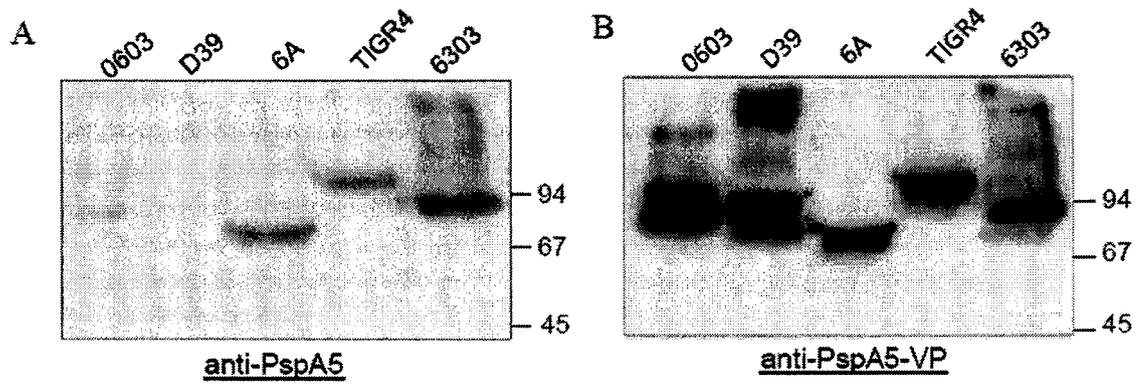


FIGURA 3

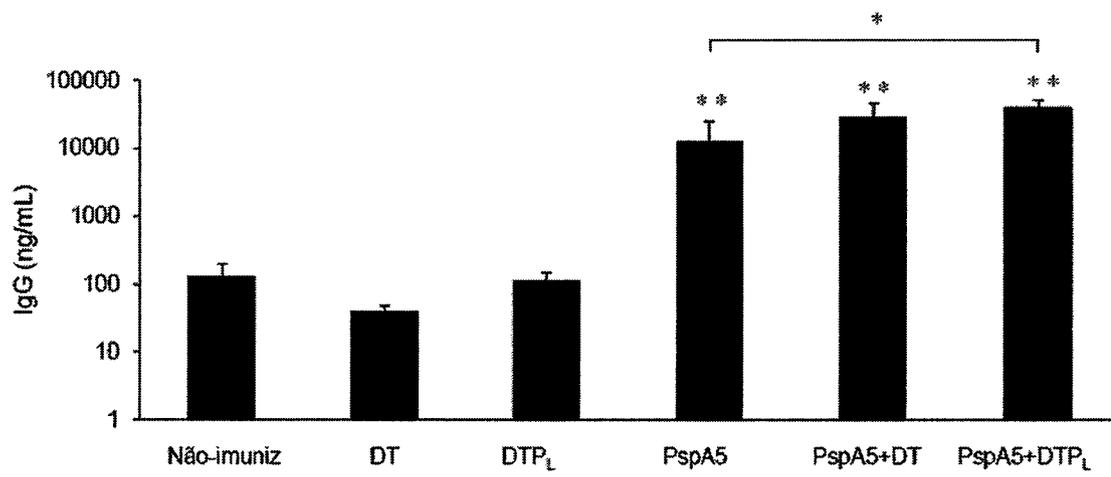


FIGURA 4

Resumo da Patente de Invenção para: **"COMPOSIÇÕES  
IMUNOGÊNICAS SINÉRGICAS BASEADAS EM ANTÍGENOS PROTÉICOS  
COMBINADOS COM ANTÍGENO CELULAR PERTUSSIS E TOXINAS  
INATIVADAS"**

5 A presente invenção refere-se a composições  
imunogênicas sinérgicas para prevenção de coqueluche e de  
infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.  
Adicionalmente, as composições da presente invenção podem  
oferecer proteção contra infecções causadas por outros  
10 patógenos através da combinação sinérgica de antígenos dos  
mesmos.

Em particular, a presente invenção fornece composições  
imunogênicas sinérgicas que compreendem ao menos um  
antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada e ao  
15 menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais  
proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus  
pneumoniae* ou fragmentos das mesmas.

A presente invenção fornece ainda fornece composições  
imunogênicas sinérgicas que compreendem ao menos um  
20 antígeno celular de *Bordetella pertussis* inativada, ao  
menos um antígeno proteico compreendendo uma ou mais  
proteínas de superfície A (PspA) de *Streptococcus  
pneumoniae* ou fragmentos das mesmas e uma ou mais toxinas  
diftéricas e/ou tetânicas.

A presente invenção refere-se também ao uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, da presente invenção na manufatura de vacinas combinadas para prevenção contra coqueluche, tétano, difteria e/ou infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

A presente invenção refere-se ainda ao uso das composições da presente invenção na manufatura de vacinas para prevenção contra coqueluche, tétano, difteria e infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.