

(11) Número de Publicação: **PT 1946771 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/385 (2011.01) **A61K 39/295** (2011.01)
A61P 31/04 (2011.01) **A61P 31/12** (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.03.28**

(30) Prioridade(s): **2001.04.03 GB 0108364**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.07.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.06.27**
164/2012

(73) Titular(es):

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
RUE DE L`INSTITUT, 89 1330 RIXENSART BE

(72) Inventor(es):

CARINE CAPIAU BE
PIERRE MICHEL DESMONS BE
JAN POOLMAN BE
DOMINIQUE BOUTRIAU BE
DOMINIQUE LEMOINE BE

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO DE VACINA MULTIVALENTE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A NOVAS FORMULAÇÕES DE VACINA COMBINADA À BASE DE DTP VANTAJOSAS E A KITS DE VACINA COMBINADA ADMINISTRADOS CONCOMITANTEMENTE. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DESTAS VACINAS E KITS.

RESUMO

“COMPOSIÇÃO DE VACINA MULTIVALENTE”

A presente invenção refere-se a novas formulações de vacina combinada à base de DTP vantajosas e a kits de vacina combinada administrados concomitantemente. São também proporcionados métodos de administração destas vacinas e kits.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÃO DE VACINA MULTIVALENTE"

A presente invenção refere-se a novas formulações de vacina combinada. As vacinas combinadas (que proporcionam protecção contra múltiplos agentes patogénicos) são muito desejáveis, de modo a minimizar o número de imunizações necessárias para conferir protecção contra múltiplos agentes patogénicos, para reduzir os custos de administração e para aumentar as taxas de aceitação e abrangência. O fenómeno bem documentado da competição (ou interferência) antigénica complica o desenvolvimento de vacinas com múltiplos componentes. A interferência antigénica refere-se à observação de que a administração de múltiplos抗igénios resulta, frequentemente, numa resposta diminuída a determinados抗igénios, em relação à resposta imunitária observada quando esses抗igénios são administrados individualmente. É imprevisível a sua ocorrência na preparação de novas combinações de抗igénios (Rappuoli *et al* (1996), *Vaccine*, **14**(7):691-700).

São conhecidas vacinas de combinação que podem prevenir *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* e, opcionalmente, o vírus da Hepatite B e/ou *Haemophilus influenzae* do tipo b (ver, por exemplo, os documentos WO 93/24148; WO 97/00697; e WO 99/48525; WO 99/13906; EP 0594950; Andre (1999), *Vaccine*, **17**: 1620-1627; Poolman *et al* (2001), *Vaccine*, **19**:2280-2285; e Pines *et al.* (1999), *Vaccine*, **17**:1650-1656; as combinações divulgadas incluem DTpA-HBV,

DTPa-HBV-IPV, DTPa/Hib, DTPa-HBV/Hib e DTPa-IPV-HBV/Hib, mas não vacinas baseadas em DTP tendo valências de *N. meningitidis* (Men)). A utilização de antigénios conjugados com Men é conhecida de, por exemplo, Paradiso e Lindberg (1996), *Developments in Biological Standardization*, **87**:269-275.

A presente invenção refere-se à preparação das vacinas multivalentes mais ambiciosas até à data, cuja administração pode prevenir ou tratar infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, poliovírus e *N. meningitidis* e, de um modo preferido, também *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e/ou vírus da Hepatite A, em que os componentes da vacina não interferem significativamente com o desempenho imunológico de qualquer um dos componentes da vacina.

Consequentemente, num aspecto da invenção é proporcionada uma composição imunogénica multivalente para conferir protecção num hospedeiro contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, poliovírus e *N. meningitidis*, compreendendo:

- (a) componentes de pertussis acelular (Pa) compreendendo toxóide de pertussis e FHA,
- (b) toxóide tetânico (TT ou T),
- (c) toxóide diftérico (DT ou D),
- (d) Antigénio de superfície da hepatite B (HepB ou HB),
- (e) Poliovírus inactivado (IPV) e

(f) um ou ambos os conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido ou oligossacárido capsular de uma bactéria seleccionada do grupo *N. meningitidis* do tipo Y (MenY) e *N. meningitidis* do tipo C (MenC) e

(g) opcionalmente um conjugado de uma proteína veículo e o polissacárido ou oligossacárido capsular de *H. influenzae* do tipo B (Hib).

A composição imunogénica acima pode ainda compreender um, dois, três, quatro, cinco ou seis componentes seleccionados da seguinte lista: polissacárido de *N. meningitidis* do tipo A [MenA] (de um modo preferido, conjugado), polissacárido de *N. meningitidis* do tipo W [MenW] (de um modo preferido, conjugado), o polissacárido Vi de *Salmonella typhi*, vesículas da membrana externa de *N. meningitidis* (de um modo preferido, serotipo B), uma ou mais proteínas da membrana externa (expostas na superfície) de *N. meningitidis* (de um modo preferido, serotipo B), vírus da Hepatite A morto, atenuado (HepA - de um modo preferido, o produto conhecido como "HavrixTM" [SmithKline Beecham Biologicals]) sem problemas de interferências substanciais para quaisquer dos antigénios da composição.

Além disso, são aqui divulgados vários kits vantajosos compreendendo duas ou três composições imunogénicas multivalentes, sendo os referidos kits capazes de conferir protecção num hospedeiro contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, poliovírus e *Streptococcus pneumoniae* e, opcionalmente, também *N. meningitidis* e *Haemophilus influenzae*.

Esse kit pode compreender duas composições imunogénicas multivalentes para conferir protecção num hospedeiro contra a doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, poliovírus e *Streptococcus pneumoniae* e, opcionalmente, também *N. meningitidis* e *Haemophilus influenzae*.

O referido kit compreende um primeiro recipiente compreendendo:

- (a) *Bordetella pertussis* em célula inteira morta (Pw) ou dois ou mais componentes de pertussis acelular (Pa) [de um modo preferido, o último],
- (b) toxóide tetânico (TT ou T),
- (c) toxóide diftérico (DT ou D),
- (d) Antigénio de superfície da hepatite B (HepB ou HB) e
- (e) Poliovírus inactivado (IPV)

e um segundo recipiente compreendendo:

- (2a) um ou mais conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [em que o polissacárido capsular é, de um modo preferido, de um serotipo pneumocócico seleccionado do grupo consistindo de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F].

Noutras formas de realização vantajosas do kit divulgado acima, o primeiro recipiente comprehende adicionalmente: (f) um ou ambos os conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de uma bactéria seleccionada do grupo *N. meningitidis* do tipo Y (MenY) e *N. meningitidis* do tipo C (MenC) e (g) um conjugado de uma proteína veículo e o polissacárido capsular de *H. influenza* do tipo B (Hib); ou o segundo recipiente comprehende adicionalmente: (2b) um ou ambos os conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de uma bactéria seleccionada do grupo *N. meningitidis* do tipo Y (MenY) e *N. meningitidis* do tipo C (MenC) e (2c) um conjugado de uma proteína veículo e o polissacárido capsular de *H. influenza* do tipo B (Hib); ou o primeiro recipiente comprehende adicionalmente: (f) um ou ambos os conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de uma bactéria seleccionada do grupo *N. meningitidis* do tipo Y (MenY) e *N. meningitidis* do tipo C (MenC) e o segundo recipiente comprehende adicionalmente (2b) um conjugado de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de *H. influenzae* do tipo B (Hib); ou o primeiro recipiente comprehende adicionalmente (f) um conjugado de uma proteína veículo e o polissacárido capsular de *H. influenzae* do tipo B (Hib) e o segundo recipiente comprehende adicionalmente: (2b) um ou ambos os conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de uma bactéria seleccionada do grupo *N. meningitidis* do tipo Y (Men Y) e *N. meningitidis* do tipo C (MenC).

Alternativamente esse kit pode comprehender duas composições imunogénicas multivalentes para conferir protecção num hospedeiro contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da

Hepatite B, poliovírus, *N. meningitidis* e *Haemophilus influenzae*.

O referido kit comprehende um primeiro recipiente contendo:

- (a) *Bordetella pertussis* em célula inteira morta (Pw) ou dois ou mais componentes de pertussis acelular (Pa) [de um modo preferido, o último],
- (b) toxóide tetânico (TT ou T),
- (c) toxóide diftérico (DT ou D),
- (d) Antigénio de superfície da hepatite B (HepB ou HB),
- (e) Poliovírus inactivado (IPV),

e um segundo recipiente comprehendendo:

- (2a) um ou ambos os conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de uma bactéria seleccionada do grupo *N. meningitidis* do tipo Y (MenY) e *N. meningitidis* do tipo C (MenC) e
- (2b) um conjugado de uma proteína veículo e o polissacárido capsular de *H. influenzae* do tipo B (Hib).

Noutra forma de realização o kit divulgado pode comprehender três composições imunogénicas multivalentes para conferir protecção num hospedeiro contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*,

vírus da Hepatite B, poliovírus, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*.

O referido kit compreende um primeiro recipiente compreendendo:

- (a) *Bordetella pertussis* em célula inteira morta (Pw) ou dois ou mais componentes de pertussis acelular (Pa) [de um modo preferido, o último],
- (b) toxóide tetânico (TT ou T),
- (c) toxóide diftérico (DT ou D),
- (d) Antigénio de superfície da hepatite B (HepB ou HB) e
- (e) Poliovírus inactivado (IPV),

e um segundo recipiente compreendendo:

- (2a) um ou mais conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [em que o polissacárido ou capsular é, de um modo preferido, de um serotipo pneumocócico seleccionado do grupo consistindo de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F],

e um terceiro recipiente compreendendo:

- (3a) um ou ambos os conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido capsular de uma bactéria seleccionada do

grupo *N. meningitidis* do tipo Y (MenY) e *N. meningitidis* do tipo C (MenC) e

(3b) um conjugado de uma proteína veículo e o polissacárido capsular de *H. influenzae* do tipo B (Hib).

Qualquer um ou os recipientes acima dos kits acima podem ainda compreender um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete componentes seleccionados da seguinte lista: polissacárido de *N. meningitidis* do tipo A [MenA] (de um modo preferido, conjugado), polissacárido de *N. meningitidis* do tipo W [MenW] (de um modo preferido, conjugado), o polissacárido Vi de *Salmonella typhi*, vesículas da membrana externa de *N. meningitidis* (de um modo preferido, serotipo B), uma ou mais proteínas da membrana externa (expostas na superfície) de *N. meningitidis* (de um modo preferido, serotipo B), HepA (como descrito acima) e uma ou mais proteínas de *S. pneumoniae* (de um modo preferido, expostas na superfície) sem problemas de interferência substancial para qualquer dos抗igénios da composição.

Os recipientes do kit podem ser embalados separadamente ou, de um modo preferido, embalados em conjunto. De um modo preferido, o kit é proporcionado com uma lista de instruções para administração das vacinas nos dois ou mais recipientes.

Quando um recipiente num kit contiver um determinado conjugado de polissacáridos, é preferido, que o mesmo conjugado não esteja presente nos outros recipientes do kit.

A requerente verificou surpreendentemente que um kit divulgado como acima, apresenta vantajosamente os vários

antigénios ao sistema imunitário de um hospedeiro de uma forma óptima. O kit proporciona a um médico assistente um método óptimo de imunização de um hospedeiro, com uma ou mais das seguintes vantagens (de um modo preferido, 2 ou 3 e, de um modo muito preferido, todas): eficácia protectora para todos os antigénios, reactogenicidade mínima, interferência mínima de supressão do veículo, interferência mínima do adjuvante/antigénio ou interferência mínima do antigénio/antigénio. Dessa forma, estes objetivos podem ser alcançados com o número mínimo de administrações (duas), de um modo preferido, ocorrendo na mesma visita ao médico assistente.

Embora numa forma de realização preferida da divulgação as vacinas do primeiro e segundo (e terceiro, quando aplicável) recipientes sejam administradas concomitantemente em diferentes locais (como descrito abaixo), numa forma de realização alternativa, a requerente prevê que os conteúdos dos primeiro e segundo recipientes possam ser misturados (de um modo preferido, extemporaneamente) antes da administração como uma vacina única.

Os antigénios da invenção

São bem conhecidos na técnica métodos de preparação do toxóide tetânico (TT). Por exemplo, o TT é, de um modo preferido, produzido por purificação da toxina a partir de uma cultura de *Clostridium tetani*, seguida por desintoxicação química, mas é alternativamente produzido por purificação de um análogo da toxina recombinante ou desintoxicado geneticamente (por exemplo, como descrito no documento EP 209281). "Toxóide tetânico" abrange também fragmentos imunogénicos da proteína

completa (por exemplo, o Fragmento C - ver o documento EP 478602).

Os métodos de preparação do toxóide diftérico (DT) são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, o DT é, de um modo preferido, produzido por purificação da toxina a partir de uma cultura de *Corynebacterium diphtheriae*, seguida por desintoxicação química, mas é alternativamente produzido por purificação de um análogo da toxina recombinante ou desintoxicado geneticamente (por exemplo, CRM197 ou outros mutantes como descritos nos documentos U.S. 4709017, U.S. 5843711, U.S. 5601827 e U.S. 5917017).

São bem conhecidos na técnica, componentes de pertussis acelular (Pa). Os exemplos incluem toxóide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN) e aglutinogénios 2 e 3. Estes antigénios são parcial ou altamente purificados. De um modo preferido, são utilizados 2 ou mais componentes de pertussis acelular na vacina. De um modo mais preferido, são incorporados na vacina 2, 3, 4 ou todos os 5 dos componentes de pertussis acelular do exemplo acima. De um modo muito preferido, são incluídos PT, FHA e PRN. O PT pode ser produzido por várias formas, por exemplo, por purificação da toxina a partir de uma cultura de *B. pertussis*, seguida por desintoxicação química ou, alternativamente, por purificação de um análogo de PT desintoxicado geneticamente (por exemplo, como descrito no documento U.S. 5085862).

No documento WO 93/24148 são divulgados métodos de preparação de *Bordetella pertussis* (Pw) em célula inteira, morta, adequados para esta invenção, uma vez que são métodos

adequados de formulação para produzir vacinas DT-TT-Pw-HepB e DT-TT-Pa-HepB.

O poliovírus inactivado (IPV) compreende, de um modo preferido, os tipos 1, 2 e 3, como é convencional na técnica das vacinas. É muito preferida a vacina da poliomielite de Salk.

Tipicamente, a vacina de *Streptococcus pneumoniae* da presente divulgação irá compreender抗igénios de polissacáridos (de um modo preferido, conjugados), em que os polissacáridos são derivados de pelo menos quatro serotipos de pneumococos escolhidos do grupo consistindo de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F. De um modo preferido, os quatro serotipos incluem 6B, 14, 19F e 23F. De um modo mais preferido, são incluídos, pelo menos, 7 serotipos na composição, por exemplo, os derivados dos serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. De um modo mais preferido, são incluídos ainda mais de 7 serotipos na composição, por exemplo, pelo menos 11 serotipos. Por exemplo, a composição numa forma de realização inclui 11 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 divulgação, são incluídos pelo menos 13抗igénios de polissacáridos (de um modo preferido, conjugados), embora sejam também contemplados outros抗igénios de polissacáridos, por exemplo, 23 valentes (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 da pneumonia), é vantajoso incluir os serotipos 8 e 12F (e, de um modo muito preferido, também os 15 e 11) à composição

antigénica 11 valente preferida descrita acima para formar uma vacina 13/15 valente, enquanto que para bebés ou crianças pequenas (em que a otite média é mais preocupante), os serotipos 6A e 19A são incluídos vantajosamente para formar uma vacina 13 valente.

Conjugados

Os conjugados de polissacáridos capsulares bacterianos podem compreender qualquer péptido, polipéptido ou proteína veículo compreendendo pelo menos um epítopo T auxiliador. De um modo preferido, a(s) proteína(s) veículo(s) utilizada(s) é(são) seleccionada(s) do grupo compreendendo: toxóide tetânico, toxóide diftérico, CRM197, toxina recombinante da difteria (como descrito em qualquer dos documentos U.S. 4709017, WO 93/25210, WO 95/33481 ou WO 00/48638), pneumolisina (de um modo preferido, quimicamente destoxicificada ou um mutante desintoxicado) de *S. pneumoniae*, OMPc de *N. meningitidis* e proteína D de *H. influenzae* (documento EP 594610). Devido ao efeito conhecido de supressão do veículo, é vantajoso que, em cada das composições da invenção os antigénios de polissacáridos contidos nestas (antigénios "n"), estejam conjugados com mais de um veículo. Deste modo, (n-1) dos polissacáridos podem ser transportados (separadamente) num tipo de veículo e 1 num veículo diferente ou (n-2) num e 2 em dois veículos diferentes, etc. Por exemplo, numa vacina contendo 4 conjugados de polissacáridos bacterianos, 1, 2 ou a totalidade dos quatro podem ser conjugados com diferentes veículos). A proteína D é, no entanto, utilizada vantajosamente como um veículo nas composições da invenção, já que esta pode ser utilizada para vários (2, 3, 4 ou mais) polissacáridos numa composição sem um

efeito significativo de supressão do veículo. De um modo muito preferido, Hib está presente como um conjugado de TT, os polissacáridos pneumocócicos são conjugados de proteína D, DT ou CRM197 e MenA, MenC, MenY e MenW são conjugados de TT ou de PD. A proteína D é também um veículo útil, uma vez que esta proporciona um抗ígenio adicional que pode proporcionar protecção contra *H. influenzae*.

Os polissacáridos podem ser ligados à proteína veículo por 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 realizada conjugação CDAP (documento WO 95/08348).

Em CDAP, é utilizado, de um modo preferido, o reagente de cianilação tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridínio (CDAP) para a síntese de conjugados polissacárido-proteína. A reacção de cianilação pode ser realizada sob condições relativamente suaves, o que evita a hidrólise dos polissacáridos sensíveis a alcalinidade. Esta síntese permite a ligação directa a uma proteína veículo.

Propriedades das composições imunogénicas da invenção

As composições imunogénicas da invenção são, de um modo preferido, formuladas como uma vacina para administração *in vivo* ao hospedeiro, de tal modo que os componentes individuais da composição são formulados de forma a que a imunogenicidade dos componentes individuais não seja substancialmente dificultada por outros componentes individuais da composição. Por não substancialmente dificultada, pretende-se significar que, após

imunização, é obtido um título de anticorpo (e. g., IgG) contra cada componente que é mais de 60%, de um modo preferido, mais de 70%, de um modo mais preferido, mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, mais de 90% e, de um modo muito preferido, mais de 95 a 100% do título obtido quando o antigénio é administrado isoladamente.

De um modo interessante, com as combinações de kits descritas acima, é possível, após imunização, obter títulos de anticorpos contra o polissacárido capsular de Hib ou alguns polissacáridos pneumocócicos aproximando-se ou excedendo 100% do título obtido quando o antigénio é administrado isoladamente.

Formulações de vacina

As composições imunogénicas da invenção são formuladas, de um modo preferido, como uma vacina para administração *in vivo* ao hospedeiro, para que estas confiram um título de anticorpo superior ao critério para a seroprotecção para cada componente antigénico para uma percentagem aceitável de indivíduos humanos. Este é um teste importante na avaliação da eficácia de uma vacina entre a população. São bem conhecidos antigénios com um título de anticorpo associado acima, do qual um hospedeiro é considerado como estando seroconvertido contra o antigénio e esses títulos estão publicados por organizações tal como a OMS. De um modo preferido, mais de 80% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos está seroconvertida, de um modo mais preferido, mais de 90%, de um modo ainda mais preferido, mais de 93% e, de um modo muito preferido, 96 a 100%.

As composições imunogénicas da invenção são, de um modo preferido, adjuvantadas. Adjuvantes adequados incluem um sal de alumínio, tais como gel de hidróxido de alumínio (alúmen) ou fosfato de alumínio, mas podem ser também um sal de cálcio, ferro ou zinco ou podem ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada ou açúcares acilados, polissacáridos derivatizados cationica ou anionicamente ou polifosfazenos.

O adjuvante pode também ser seleccionado para ser um indutor preferido, de um tipo Th1 de resposta para auxiliar o ramo mediado por células da resposta imunitária.

Níveis elevados de citocinas do tipo Th1 tendem a favorecer a indução das respostas imunitárias mediadas por células contra um determinado抗原, enquanto elevados níveis de citocinas do tipo Th2 tendem a favorecer a indução de respostas imunitárias humorais contra o抗原.

Sistemas adjuvantes adequados que promovem uma resposta predominantemente Th1, incluem o lípido A monofosforílico ou um seu derivado, particularmente o lípido A monofosforílico 3-des-O-acilado e uma combinação de lípido A monofosforílico, de um modo preferido, lípido A monofosforílico 3-des-O-acilado (3D-MPL) juntamente com um sal de alumínio. Um sistema melhorado envolve a combinação de um lípido A monofosforílico e um derivado de saponina, particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL, como divulgado no documento WO 94/00153 ou uma composição menos reactiva em que QS21 seja atenuado com colesterol, como divulgado no documento WO 96/33739. No documento WO 95/17210 é descrita uma formulação adjuvante particularmente potente, envolvendo QS21, 3D-MPL e tocoferol numa emulsão de óleo em água. A vacina pode ainda compreender

adicionalmente uma saponina, de um modo mais preferido, QS21. A formulação pode também compreender uma emulsão de óleo em água e tocoferol (documento WO 95/17210). Oligonucleótidos contendo CpH não metilado (documento WO 96/02555) são também indutores preferidos de uma resposta TH1 e são adequados para utilização na presente invenção.

Os sais de alumínio são adjuvantes preferidos nas composições imunogénicas acima. Em particular, HepB deve estar, de um modo preferido, adsorvida em fosfato de alumínio antes da mistura com os outros componentes. A pertactina é adsorvida, de um modo preferido, em hidróxido de alumínio antes da mistura com os outros componentes. Os conjugados de polissacárido podem ser não adjuvantados, para minimizar os níveis de adjuvante (particularmente os sais de alumínio) nas composições da invenção.

A presente invenção proporciona também um método para produzir uma formulação de vacina compreendendo a etapa de mistura dos componentes da vacina juntamente com um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Uma composição de DTPa particularmente preferida da invenção compreende: TT, DT, Pa (compreendendo PT, FHA e opcionalmente PRN - com PRN, de um modo preferido, adsorvida em hidróxido de alumínio), HepB (de um modo preferido, adsorvida em fosfato de alumínio), IPV, MenC (de um modo preferido, conjugado com qualquer das proteínas D, TT, DT ou CRM197) e, opcionalmente, MenY (de um modo preferido, conjugado com qualquer das proteínas D, TT, DT ou CRM197). A composição pode também compreender opcionalmente Hib (de um modo preferido, conjugado com TT e/ou não adsorvida em adjuvante). De um modo

preferido, a vacina pode ser proporcionada em 2 frasquinhos, o primeiro contendo DTPa-IPV-HepB numa forma líquida e um segundo contendo MenC (e, opcionalmente, MenY e/ou Hib) numa forma liofilizada, de um modo preferido, na presença de um agente anti-agregante, tal como sacarose, lactose ou trealose. Os conteúdos dos frasquinhos podem ser misturados extratemporaneamente num único recipiente antes da administração a um hospedeiro numa administração/injecção única. Esta composição pode ser também utilizada num kit descrito acima (os conteúdos do primeiro recipiente).

Para o objectivo dos kits compreendendo um recipiente contendo Hib (de um modo preferido, conjugado com TT e/ou não adsorvido em adjuvante) e/ou um ou ambos de MenC e MenY (de um modo preferido, conjugados em qualquer das proteínas D, TT, DT ou CRM197 e/ou não adsorvido em adjuvante), esta composição é, de um modo preferido, armazenada numa forma liofilizada, de um modo preferido, na presença de um agente anti-agregante, tais como sacarose, lactose ou trealose.

Para o objectivo das composições DTPa da invenção compreendendo um recipiente contendo DTPa e Hib e/ou um ou ambos de MenC e MenY, em que os componentes Hib e/ou Men são conjugados com TT, é preferido, equilibrar o conteúdo de TT na vacina, para que o conteúdo total de TT num único recipiente seja não mais do que um limiar crítico (tais como 40, 45, 50, 60, 70 ou 80 µg de TT) para reduzir, minimizar ou prevenir a interferência imunitária do TT ou a supressão do veículo de polissacáridos conjugados com TT. De um modo preferido, este limiar é 50 µg. A requerente verificou que a proporção polissacárido:TT pode ser reduzida nos conjugados acima para 1:0,5 a 1,5 em peso (de um modo preferido, 1:0,6 a 1,2, de um

modo muito preferido, cerca de 1:1) para ser benéfica no que a isto respeita. Por exemplo, numa vacina DTPa-HB-IPV-Hib(TT)-MenC(TT), a quantidade de T em DTPa deve, de um modo preferido, ser reduzida abaixo de uma quantidade padrão típica (de um modo preferido, cerca de um a três quartos, de um modo muito preferido, cerca de metade da quantidade normal) para, por exemplo, 10 a 30 µg de TT, de um modo preferido, 20 a 25 µg de TT. Por exemplo, se a quantidade de TT conjugado com Hib for cerca de 12 µg de TT e a quantidade conjugada com MenC for cerca de 5 µg de TT e a quantidade de TT não conjugado for 24 µg, então o total de TT irá ser cerca de 41 µg.

Uma composição de polissacáridos de Hib/pneumocócicos particularmente preferida de acordo com a presente divulgação (para utilização independente ou como os conteúdos do segundo recipiente de um dos kits descritos acima) compreende: Hib (de um modo preferido, conjugado com TT e/ou não adsorvido em adjuvante) e conjugados de polissacáridos pneumocócicos (por exemplo, as combinações descritas no parágrafo sobre "a vacina de *Streptococcus pneumoniae* da presente divulgação" acima) múltiplos (por exemplo, mais de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11). De um modo muito preferido, são incluídos 11 polissacáridos (dos serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F). De um modo preferido, os polissacáridos pneumocócicos são conjugados com PD, DT, CRM197 ou TT. Numa forma de realização preferida, o antigénio do polissacárido de Hib não é adsorvido num adjuvante, particularmente sais de alumínio. Embora o(s) antigénio(s) de polissacáridos pneumocócicos possa(m) ser adjuvantado(s) (de um modo preferido, com fosfato de alumínio), estes podem também não ser adsorvidos num adjuvante, particularmente sais de alumínio. Numa forma de realização particular, não existe qualquer sal adjuvante de alumínio

presente na composição. Podem ser incluídos outros抗igénios nas composições divulgadas (por exemplo, o conjugado de polissacáridos capsulares de *N. meningitidis* do tipo C [de um modo preferido, conjugado com qualquer proteína D, TT, DT ou CRM197 e/ou não adsorvido em adjuvante]), no entanto, numa forma de realização alternativa, os conjugados de polissacárido de Hib e pneumocócico são os únicos抗igénios presentes na composição. Numa outra forma de realização específica das formulações divulgadas acima, os polissacáridos de Hib e pneumocócicos não são conjugados com o mesmo veículo (particularmente quando o veículo é CRM197).

A vacina pode ser proporcionada num recipiente (com os conteúdos numa forma líquida ou liofilizada) ou em dois frasquinhos, o primeiro contendo Hib (de um modo preferido, liofilizado), o segundo contendo os抗igénios pneumocócicos (de um modo preferido, numa forma líquida). As composições liofilizadas estão, de um modo preferido, na presença de um agente anti-agregante, tais como sacarose, lactose ou trealose. Os conteúdos dos frasquinhos podem ser misturados extemporaneamente num único recipiente antes da administração a um hospedeiro numa administração/injecção única. Com essa formulação é possível, após a imunização, obter títulos de anticorpos contra o polissacárido capsular de Hib, aproximando-se ou muito frequentemente excedendo 100% do título obtido quando o抗igénio é administrado isoladamente. Em formas de realização preferidas, não ocorre qualquer efeito prejudicial (significativamente) com os conjugados de polissacáridos pneumocócicos (em termos de eficácia protectora) na combinação em comparação com sua administração isoladamente. Isto pode ser avaliado em termos de medição das concentrações médias geométricas (GMC) pós-primárias de anticorpo anti-polissacárido

1 mês após a última dose primária (sendo as doses primárias as administrações iniciais - normalmente 3 - no primeiro ano de vida). A GMC (em μ g/mL) para a vacina da invenção deve estar de um modo preferido, superior a 55% (de um modo mais preferido, superior a 60, 70, 80 ou 90%) da GMC quando os polissacáridos pneumocócicos são administrados sem o conjugado de Hib. Outra indicação de que não ocorreu qualquer efeito prejudicial é se a % de indivíduos com concentrações de anticorpo de não menos de 0,5 μ g/mL diferir em não mais de 10% (de um modo preferido, menos de 9, 7, 5, 3 ou 1%) quando comparando 1 mês de administrações pós-primárias da vacina divulgada *versus* a vacina sem o conjugado de Hib.

Embora o acima se refira a "polissacáridos" de Hib, pneumocócicos e meningocócicos, considera-se que a invenção pode ser alargada a "polissacáridos reduzidos" e a "oligossacáridos" (polissacáridos reduzidos em tamanho para maneabilidade, que sejam ainda capazes de induzir uma resposta imunitária protectora num hospedeiro) de Hib e pneumocócicos, que são bem conhecidos na técnica das vacinas (ver, por exemplo, o documento EP 497525). Vantajosamente, pode estar presente MenY como um conjugado de oligossacárido com o oligossacárido 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 ou 0,9 vezes o peso molecular do polissacárido nativo.

É aqui divulgada uma composição imunogénica ou vacina como aqui descrita, para utilização num medicamento.

Num aspecto da invenção é proporcionada uma utilização das composições imunogénicas da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de doenças causadas pela infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*,

Corynebacterium diphtheriae, vírus da Hepatite B, poliovírus e *N. meningitidis* (e opcionalmente *H. influenzae*). É divulgada uma utilização das composições imunogénicas da invenção na preparação de um kit de vacina para o tratamento ou prevenção de doenças causadas por infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, poliovírus, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *N. meningitidis*.

Adicionalmente, é também, divulgado um método para imunizar um hospedeiro humano contra doença causada por *Bordetella Pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, poliovírus e *N. meningitidis* (e opcionalmente *H. influenzae*), em que o método compreende administrar uma dose imunoprotectora da composição imunogénica da invenção ao hospedeiro.

Um outro aspecto da divulgação refere-se a um método de imunização de um hospedeiro humano contra a doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B e poliovírus e um ou mais de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *N. meningitidis*, com os kits descritos acima, em que o método envolve uma calendarização de administração concomitante como definida abaixo.

Calendarização de administração concomitante

Essa calendarização compreende a etapa de administrar a um hospedeiro uma dose imunoprotectora de uma composição imunogénica de um primeiro recipiente de um kit (por exemplo, um

dos kits aqui divulgados) num local diferente drenado por um nódulo linfático diferente do local em que é administrada a composição imunogénica do segundo (ou terceiro) recipiente do kit. De um modo preferido, os locais diferentes são membros diferentes. De um modo preferido, a administração das vacinas ocorre em 24 horas uma da outra, de um modo mais preferido, no mesmo dia e, de um modo muito preferido, na mesma visita do hospedeiro ao médico. De um modo preferido, o hospedeiro é, subsequentemente, iniciado com ambas (ou todas) as vacinas da mesma forma uma ou mais (de um modo preferido, 2) vezes adicionais, cada vez separada por 2 a 12 semanas (de um modo preferido, aproximadamente 1 mês). Frequentemente, pode ser administrada uma terceira administração inicial entre 2 semanas e 7 meses após a segunda administração. Por exemplo, a vacina pode ser administrada como acima, de acordo com uma calendarização de administração normal para as vacinas DTP (tal como um sistema de três visitas, cada visita é separada por 1 mês, por exemplo, uma calendarização de 3, 4 e 5 meses de idade; ou uma calendarização de 3, 5 e 11; ou uma calendarização de 3, 5 e 12 meses de idade). Essa calendarização de administração permite a optimização da resposta imunitária contra os antigénios em ambos (ou todos) os recipientes do kit.

Pode ser proporcionada uma administração de reforço das vacinas da mesma forma a em qualquer momento a partir do segundo ano de vida até a idade adulta. Embora a aplicação seja, de um modo preferido, realizada através da via intramuscular, o reforço pode ser realizado vantajosamente por via mucosal, opcionalmente na presença de um adjuvante mucosal (de um modo preferido, laureth 9 ou Toxina Termolábil [LT] de *E.coli* e os seus mutantes ou fragmentos), (por exemplo, a administração intranasal das vacinas é fácil de administrar e pode funcionar

extremamente bem, especialmente quando o hospedeiro é iniciado do parentericamente) e o local de administração das vacinas não necessita de drenar para os diferentes nódulos linfáticos.

É também divulgada a utilização das composições imunogénicas da invenção dentro dos recipientes num método de preparação de um kit de vacina como aqui divulgado para administração concomitante.

Kits compreendendo TT em dois ou mais recipientes

Um outro aspecto da divulgação refere-se a kits de vacina para administração concomitante (como definido acima), em que os conteúdos de TT de dois ou mais recipientes são equilibrados para vantajosamente reduzir, minimizar ou prevenir a interferência imunitária do TT ou a supressão do veículo dos polissacáridos conjugados com TT. O TT é um veículo extremamente bom, no entanto é conhecido que este tem limitações se utilizado em excesso numa composição de vacina, particularmente se estiver também presente TT livre. Se utilizado excessivamente, todos os抗igénios conjugados com TT apresentam títulos de anticorpos reduzidos. Existe portanto um problema distinto na técnica de como utilizar TT em muitas áreas diferentes (por exemplo, como抗igénio livre e como veículo para muitos抗igénios de polissacáridos) dentro de uma grande vacina combinada sem as desvantagens acima. A presente requerente encontrou um método óptimo para solucionar este problema; que pela utilização de uma calendarização de administração concomitante de um kit (como definido acima), pode ser administrada uma vacina num primeiro recipiente, compreendendo TT numa quantidade não superior a um limiar crítico quando ocorre interferência imunitária ou

supressão do veículo, com uma vacina num segundo (e opcionalmente terceiro) recipiente compreendendo TT numa quantidade não superior a um limiar crítico quando ocorre interferência imunitária ou supressão do veículo, de forma a que a quantidade total de TT administrado concomitantemente fique acima deste limiar crítico e a interferência imunitária (ou a supressão do veículo) é minimizada (*i.e.*, menos do que se os componentes tivessem sido administrados numa injecção) e de um modo preferido, não ocorre de todo. O limiar crítico pode ser de 40, 45, 50, 60, 70 ou 80 µg de TT e é, de um modo preferido, de cerca de 50 µg de TT. O máximo total de TT que pode ser administrado é, consequentemente, aproximadamente até uma quantidade derivada do número de recipientes do kit (dois ou três) multiplicada pelo limiar crítico.

Consequentemente é aqui divulgado um kit compreendendo dois (ou três) recipientes contendo duas (ou três) composições imunogénicas para administração concomitante, compreendendo, cada, TT numa forma livre e/ou conjugada, em que a quantidade de TT em cada recipiente não é superior a um limiar crítico para prevenir ou minimizar os efeitos da interferência imunitária (ou supressão do veículo), mas o total de TT em todos os recipientes é maior do que o referido limiar crítico.

De um modo preferido, pelo menos um dos recipientes deve incluir TT livre (não conjugado), de um modo muito preferido, no contexto de uma vacina multivalente de DTPa ou DTPw. Embora a quantidade de TT livre possa estar presente, próxima dos níveis normais de aproximadamente 42 µg, uma outra vantagem do kit divulgado possibilita que estejam presentes menores quantidades (10 a 30 ou 10 a 20 µg, por exemplo, 10, 15, 20, 25 ou 30 µg), mas podem ainda ser promovidos títulos óptimos de anticorpos

anti-TT com efeitos mínimos (ou nenhuns) de interferência imunitária ou de supressão do veículo.

De um modo preferido, pelo menos um (mas possivelmente 2 ou 3) dos recipientes deve incluir pelo menos um (mas possivelmente 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou mais) polissacárido conjugado com TT. Quando o TT livre está presente num recipiente, é preferido, que pelo menos um polissacárido conjugado com TT esteja num dos outros recipientes do kit. O polissacárido pode ser qualquer descrito neste pedido, de um modo preferido, um ou mais polissacáridos pneumocócicos (como descrito acima) ou MenC, MenY ou Hib.

De um modo preferido, o kit é qualquer dos kits descritos acima.

De um modo preferido, um, dois, três ou todos os conjugados de polissacárido-TT presentes no kit são de forma a que a proporção de polissacárido:TT seja reduzida (em comparação com conjugados padrão) a 1:0,5 a 1,5 em peso (de um modo preferido, 1:0,6 a 1,2, de um modo muito preferido, cerca de 1:1), para que os conjugados sejam ainda imunologicamente funcionais, mas os efeitos de interferência imunitária do TT ou de supressão do veículo sejam facilitados em serem minimizados ou prevenidos.

É divulgado ainda um método para imunizar um hospedeiro humano utilizando o kit acima, em que o método compreende a administração de uma dose imunoprotectora da composição imunogénica do primeiro recipiente ao hospedeiro num primeiro local, a administração de uma dose imunoprotectora da composição imunogénica do segundo recipiente ao veículo, num segundo local (e, opcionalmente, a administração de uma dose imunoprotectora da composição imunogénica do terceiro recipiente ao hospedeiro

num terceiro local), em que o primeiro e o segundo (e o terceiro) locais são drenados por nódulos linfáticos diferentes.

A administração concomitante deve ser realizada como descrito acima. De um modo preferido, o primeiro e o segundo (e o terceiro) locais representam membros diferentes do hospedeiro. De um modo preferido, a administração das composições imunogénicas do primeiro e do segundo (e do terceiro) recipientes ocorre no mesmo dia. De um modo preferido, o hospedeiro é, subsequentemente, vacinado da mesma forma uma ou vezes mais adicionais, cada vez separada por 2 a 12 semanas, de um modo mais preferido, duas outras vezes, cada vez separada por, aproximadamente, um período de 1 a 2 meses.

Kits compreendendo DT ou CRM197 em dois ou mais recipientes

Ainda um outro aspecto da divulgação refere-se a kits de vacina para administração concomitante (como definida acima), quando o conteúdo em DT (incluindo DT e quaisquer mutantes imunologicamente idênticos, tal como CRM197) de dois ou mais recipientes está equilibrado vantajosamente para intensificar os títulos de anticorpos de polissacáridos conjugados com DT (ou CRM197), minimizando simultaneamente a reactogenicidade (isto é, reactogenicidade mais baixa do que se os componentes dos recipientes fossem administrados numa injeção única). A DT e o CRM197 são veículos extremamente bons, no entanto é conhecido que a DT contribui amplamente para a reactogenicidade de vacinas que a contém. A presente requerente verificou que, pela utilização de uma calendarização de administração concomitante do kit (de acordo com o definido acima), uma vacina num primeiro recipiente compreendendo DT (e/ou CRM197) está presente

vantajosamente numa quantidade elevada (40 a 150 µg, de um modo preferido, 60 a 120 µg, de um modo mais preferido, 70 a 100 µg, de um modo muito preferido, cerca de 95 µg), quando é administrada concomitantemente uma vacina num segundo (e opcionalmente terceiro) recipiente compreendendo um polissacárido conjugado com DT ou a CRM197.

As vantagens são que a) embora o conteúdo em DT seja elevado no primeiro recipiente, este não é suficientemente elevado para induzir os efeitos de interferência imunitária do DT ou de supressão do veículo, b) o conjugado de polissacárido com DT ou CRM-197 é separado do primeiro recipiente de modo a que a reactogenicidade da vacina do primeiro recipiente não seja aumentada e ainda c) o título de anticorpos contra o polissacárido conjugado com DT ou CRM197 não é reduzido e pode ser intensificado (níveis maiores em comparação com quando o conjugado é administrado separadamente ou em comparação com quando se encontram presentes quantidades menores de DT no primeiro recipiente).

Consequentemente, é aqui divulgado um kit compreendendo dois (ou três) recipientes contendo duas (ou três) composições imunogénicas para administração concomitante (como definido acima), em que o primeiro recipiente compreende um conteúdo de DT (DT mais CRM197; de um modo preferido, livre ou não conjugado) e o segundo (e terceiro) recipientes compreendem um ou mais polissacáridos conjugados com DT e/ou CRM197.

De um modo preferido, o primeiro recipiente deve incluir DT livre (não conjugado), de um modo muito preferido, no contexto de uma vacina multivalente de DTPa ou DTPw.

O polissacárido ou polissacáridos conjugados com DT/CRM197 podem ser quaisquer descritos neste pedido; de um modo preferido, um ou mais da seguinte lista: polissacáridos pneumocócicos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F ou 33F, MenC, MenY ou Hib. De um modo preferido, a resposta imunitária (títulos de anticorpos) contra um ou mais destes polissacáridos é mantida em comparação com a administração do conjugado isoladamente e é, de um modo muito preferido, intensificada.

De um modo preferido, o kit é qualquer dos kits descritos acima.

De um modo preferido, um, dois, três ou todos os conjugados de polissacárido-DT (ou CRM197) presentes no kit são de forma a que a proporção de polissacárido:DT/CRM197 seja reduzida (em comparação com conjugados padrão) para 1:0,5 a 1,5 em peso (de um modo preferido, 1:0,6 a 1,2, de um modo muito preferido, cerca de 1:1).

É ainda divulgado um método para imunizar um hospedeiro humano, com a utilização do kit acima, em que o método compreende administrar uma dose imunoprotectora da composição imunogénica do primeiro recipiente ao hospedeiro num primeiro local, administrar uma dose imunoprotectora da composição imunogénica do segundo recipiente ao hospedeiro num segundo local (e opcionalmente administrar uma dose imunoprotectora da composição imunogénica do terceiro recipiente ao hospedeiro num terceiro local), em que o primeiro e o segundo (e o terceiro) locais são drenados por nódulos linfáticos diferentes.

A administração concomitante deve ser realizada como descrito acima. De um modo preferido, o primeiro e o segundo (e o terceiro) locais representam membros diferentes do hospedeiro. De um modo preferido, a administração das composições imunogénicas do primeiro e segundo (e terceiro) recipientes ocorre no mesmo dia. De um modo preferido, o hospedeiro é, subsequentemente, vacinado da mesma forma uma ou mais vezes, cada vez separada por 2 a 12 semanas, de um modo mais preferido, duas mais vezes, cada vez separada por um período de aproximadamente 1 a 2 meses.

As preparações de vacina da presente invenção podem ser utilizadas para proteger ou tratar um mamífero susceptível a infecção, por administração da referida vacina através da via sistémica ou mucosa. Estas administrações podem incluir injeção através das vias intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea; ou através da administração mucósica aos tractos oral/alimentar, respiratório (e. g., intranasal), geniturinário.

A quantidade de抗原 em cada dose de vacina é seleccionada como uma quantidade que induz uma resposta imunoprotectora sem efeitos secundários significativos adversos em vacinas típicas. Essa quantidade irá variar dependendo de que imunógeno específico é utilizado e como este é apresentado. Geralmente, é esperado que cada dose comporte 0,1 a 100 µg de polissacárido, de um modo preferido, 0,1 a 50 µg, de um modo preferido, 0,1 a 10 µg, de que 1 a 5 µg é a gama mais preferida.

O conteúdo de抗原s proteicos na vacina irá situar-se tipicamente na gama de 1 a 100 µg, de um modo preferido, 5 a 50 µg, mais tipicamente na gama de 5 a 25 µg.

Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber uma ou mais imunizações de reforço adequadamente intervaladas.

A preparação de vacina é descrita de um modo geral em *Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach"* (eds. Powell M.F. & Newman M.J.), (1995), Plenum Press, Nova Iorque). A encapsulação nos lipossomas é descrita por Fullerton, Patente U.S. 4235877.

EXEMPLOS

São proporcionados exemplos apenas para objectivos de ilustração e não pretendem limitar o âmbito da invenção.

Exemplo 1: Preparação de uma vacina DT-TT-Pa-IPV-HepB (DTPaIPVHepB)

Esta foi realizada como descrito no documento WO 93/24148. A vacina está comercialmente disponível sob a designação Infanrix-PeNTaTM (SmithKline Beecham Biologicals).

Exemplo 2: Preparação de uma vacina MenC ou MenC-MenY

MenC: Polissacárido capsular de *N. meningitidis* do tipo C conjugado com a proteína D ou com o TT (utilizando a técnica CDAP) presente numa quantidade de 5 µg de polissacárido no conjugado por 0,5 mL de dose humana. O pH foi ajustado para 6,1 e foi liofilizado na presença de sacarose.

MenCMenY: Foram misturados entre si polissacárido capsular de *N. meningitidis* do tipo C conjugado com a proteína D ou com o TT (utilizando a técnica CDAP) e polissacárido capsular de *N. meningitidis* do tipo Y conjugado ou com a proteína D ou com o TT, numa quantidade de 5 µg de polissacárido em cada conjugado por 0,5 mL de dose humana. O pH foi ajustado para 6,1 e foi liofilizado na presença de sacarose.

Exemplo 3: Preparação de uma vacina DT-TT-Pa-IPV-HepB-MenC-MenY (DTPaIPVHepB/MenCMenY) ou de uma vacina ET-TT-Pa-IPV-HepB-MenC (DTPaIPVHepB/MenC)

Foram misturadas as vacinas do Exemplo 1 e do Exemplo 2 extemporaneamente (no mesmo dia) antes da utilização.

Exemplo 4: Preparação de uma Vacina Hib – conjugado pneumocócico 11 valente (Hib/Strep11V)

Foi dissolvido polissacárido capsular de *H. influenzae* do tipo b conjugado com TT (10 µg de polissacárido no conjugado por dose) que tinha sido liofilizado a um pH de 6,1 na presença de lactose [Hiberix™ (SmithKline Beecham Biologicals)] extemporaneamente (no mesmo dia da utilização) numa solução líquida de polissacárido capsular pneumocócico undecavalente (serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) conjugado com PD (1 µg de polissacárido em cada conjugado por dose). A vacina pneumocócica tinha sido previamente adsorvida em 0,5 mg de Al³⁺ (como AlPO₄).

Exemplo 5: Ensaios Clínicos

Estudos sobre a Vacina do Exemplo 4

Foram administradas a vacina do Exemplo 4 e uma vacina de controlo numa calendarização de três doses (3, 4, 5 meses de idade) a bebés alemães.

Os resultados da resposta imunitária (medidos 1 mês após a última administração primária) foram como segue.

Anticorpos IgG antipneumocócicos: GMC (μ g/mL) (por Elisa)

Anticorpo PS	Tempo	Grupo A			Grupo D		
		N	S+ [%]	GMC	N	S+ [%]	GMC
Anti-1	PIII	30	100	1,23	33	100	0,99
Anti-3	PIII	30	100	2,04	33	97,0	1,20
Anti-4	PIII	30	100	0,98	33	100	1,03
Anti-5	PIII	30	100	1,33	33	100	1,34
Anti-6B	PIII	30	100	0,54	33	100	0,62
Anti-7F	PIII	30	100	1,60	33	100	1,33
Anti-9V	PIII	30	100	1,61	33	100	1,21
Anti-14	PIII	30	100	2,27	33	100	2,32
Anti-18C	PIII	30	100	1,06	33	100	1,04
Anti-19F	PIII	30	100	2,05	33	100	1,92
Anti-23F	PIII	30	96,7	0,75	33	96,7	0,76

Grupo A = 11Pn-PD + Infanrix - HeXaTM (Infanrix-Penta mais

conjugado de Hib adicionado - DTPa-HB-IPV-Hib)

Grupo D = 11Pn-PD/Hib + Infanrix - PeNTaTM (DTPa-HB-IPV)

+ indica administração concomitante (em membros diferentes) em vez da administração combinada.

Percentagem de indivíduos com concentrações de anticorpos não inferiores a 0,5 µg/mL

Grupo	PS 1	3	4	5	6B	7F	7V	14	18C	19F	23F
D	84,8	87,9	87,9	90,9	51,5	90,9	93,9	97,0	81,8	97,0	72,7
A	86,7	96,7	76,7	90,0	50,0	93,3	90,0	90,0	80,0	96,7	66,7

Anticorpos anti PRP: GMC (µg/mL) (por Elisa)

		Grupo D (N = 34)	
		n	≥1 µg/mL [%]
Anti-PRP	PIII	33	100
			10,75

100% dos indivíduos tinham concentrações de anticorpos anti-PRP não inferiores a 1,0 µg/mL.

O Hiberix (conjugado de Hib-TT não adsorvido) tem uma GMC de cerca de 6 µg/mL após uma calendarização de administração semelhante.

A resposta imunitária, em termos de anticorpos ELISA, de bebés que tinham recebido a vacina 11Pn-PD/Hib foi semelhante à observada para os que tinham recebido a vacina 11Pn-PD para todos os serotipos, com excepção dos serotipos 1, 3 e 9V, para os quais foi observada uma tendência para menores concentrações médias geométricas para a vacina 11Pn-PD/Hib. No entanto, estas diferenças não foram significativas, como mostrado pela sobreposição dos intervalos de confiança a 95%.

A vacina 11Pn-PD/Hib induziu anticorpos funcionais (opsonofagocíticos) para todos os 11 serotipos.

A combinação da vacina Hib com a vacina do conjugado pneumocócico não interferiu significativamente com a resposta imunitária pneumocócica e, surpreendentemente, intensificou a resposta anti-PRP em comparação com ambas as vacinas registradas Infanrix-HeXa e Hiberix.

Estudos sobre as Vacinas do Exemplo 3 ou a Administração Concomitante das Vacinas do Exemplo 3 e do Exemplo 4

Estudo 1:

Podem ser avaliadas a segurança e a imunogenicidade de Infanrix-PeNTa misturado com a vacina de conjugado MenC administrada com uma vacina Hib ou concomitantemente com a vacina pneumocócica 11 valente misturada com Hiberix. Podem ser avaliados veículos PD e TT para o conjugado MenC. As vacinas podem ser administradas como uma vacina de três doses a bebés. A injecção concomitante pode ser realizada em membros diferentes, administrada na mesma visita ao médico.

Estudo 2:

Podem ser avaliadas a segurança e a imunogenicidade de Infanrix-PeNTa misturado com a vacina do conjugado de MenC-MenY administrada com uma vacina Hib ou concomitantemente com a vacina pneumocócica 11 valente misturada com Hiberix. Podem ser avaliados o veículo PD e TT para os conjugados MenC e MenY. As

vacinas podem ser administradas como uma vacina de três doses a bebés. A injecção concomitante pode ser em membros diferentes, administrada na mesma visita ao médico assistente.

Lisboa, 20 de Agosto de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogénica multivalente adequada para conferir proteção num hospedeiro contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da hepatite B, poliovírus e *N. meningitidis* compreendendo:
 - a) componentes de pertussis acelular compreendendo toxóide de pertussis e FHA,
 - b) toxóide tetânico,
 - c) toxóide diftérico,
 - d) Antigénio de superfície da hepatite B,
 - e) poliovírus inactivado, e
 - f) um ou ambos os conjugados de uma proteína veículo e um polissacárido ou oligossacárido capsular de uma bactéria seleccionada do grupo *N. meningitidis* do tipo Y e *N. meningitidis* do tipo C
2. Composição imunogénica da reivindicação 1, compreendendo ainda um ou um mais conjugados de uma proteína veículo e um oligossacárido ou polissacárido capsular de uma bactéria seleccionada do grupo *H. influenzae* do tipo b, *N. meningitidis* do tipo A e e *N. meningitidis* do tipo W.

3. Composição imunogénica da reivindicação 1 ou 2 compreendendo ainda vírus da hepatite A morto, atenuado.
4. Composição imunogénica das reivindicações 1-3 em que a(s) proteína(s) veículo utilizada(s) é(são) selecionada(s) do grupo compreendendo: toxóide tetânico, toxóide diftérico, CRM197, toxina diftérica recombinante, OMPC de *N. meningitidis*, pneumolisina de *S. pneumoniae* e proteína D de *H. influenzae*.
5. Composição imunogénica das reivindicações 1-4 compreendendo ainda um adjuvante.
6. Composição imunogénica da reivindicação 5, em que o adjuvante são sais de alumínio.
7. Composição imunogénica das reivindicações 1-6, em que o componente de pertussis acelular compreende ainda pertactina adsorvida em hidróxido de alumínio.
8. Utilização da composição imunogénica das reivindicações 1-7 na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de doença causada por infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da hepatite B, poliovírus e *N. meningitidis*.
9. Processo de preparação da composição imunogénica multivalente das reivindicações 1-7 compreendendo o passo de misturar em conjunto os componentes individuais.
10. Composição imunogénica das reivindicações 1-7 para utilização no tratamento ou prevenção da doença causada por

infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da hepatite B, poliovírus e *N. meningitidis*.

Lisboa, 20 de Agosto de 2012