

(11) Número de Publicação: **PT 1361890 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/145 (2011.01) **C12N 7/04** (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.02.21**

(30) Prioridade(s): **2001.02.23 GB 0104538**
2001.03.26 GB 0107511
2001.04.03 GB 0108365

(43) Data de publicação do pedido: **2003.11.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.03.30**
109/2011

(73) Titular(es):

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

(72) Inventor(es):

CHRISTIAN VAN HOECKE BE
NATHALIE GARCON BE
MONCEF MOHAMED SLAOUI BE

(74) Mandatário:

ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO PT
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÕES VACINAIS DE INFLUENZA PARA DISTRIBUIÇÃO INTRADÉRMICA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO DE UMA PREPARAÇÃO TRIVALENT ANTIGÉNICA DE INFLUENZA NÃO VIVA, PARTICULARMENTE UMA PREPARAÇÃO DE INFLUENZA FRACCIONADA, NA PREPARAÇÃO DE UMA VACINA DE INFLUENZA PARA DISTRIBUIÇÃO INTRADÉRMICA EM MONODOSE. EM PARTICULAR, A INVENÇÃO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES DE INFLUENZA FRACCIONADAS, EM QUE A VACINA COMPREENDE, PELO MENOS, UM SURFACTANTE NÃO IÓNICO, SELECCIONADO DO GRUPO CONSISTINDO NOS OCTILFENOXPOLIOXIETANÓIS OU NONILFENOXPOLIOXIETANÓIS (POR EXEMPLO, A SÉRIE TRITON_z COMERCIALMENTE DISPONÍVEL), ÉSTERES DE POLIOXIETILENO SORBITANO (SÉRIE TWEEN_z) E ÉTERES OU ÉSTERES DE POLIOXIETILENO, DE FÓRMULA GERAL (I): HO(CH₂CH₂O)_n-A-R, NA QUAL N É 1-50, A É UMA LIGAÇÃO OU -C(O)-, R É ALQUILOC1-50 OU FENILALQUILOC1-50; E COMBINAÇÕES DE DOIS OU MAIS DESTES.

DESCRIÇÃO

"FORMULAÇÕES VACINAIS DE INFLUENZA PARA DISTRIBUIÇÃO INTRADÉRMICA"

Esta invenção refere-se a formulações vacinais de influenza, proporcionadas num dispositivo para distribuição intradérmica, métodos para preparação das mesmas e sua utilização em profilaxia ou terapia. De um modo mais particular, a invenção refere-se à utilização de vacinas de influenza que podem ser administradas intradermicamente, numa única dose, de modo a alcançar uma resposta imunitária suficiente para cumprir requisitos regulamentares.

O vírus influenza é um dos vírus mais ubíquos presente no mundo, afectando tanto humanos como gado. O impacto económico da influenza é significativo.

O vírus influenza é um vírus de ARN com envelope, com um tamanho de partícula de cerca de 125 nm em diâmetro. Consiste, basicamente, numa nucleocápside interna ou núcleo de ácido ribonucleico (ARN) associado a nucleoproteína, rodeado por um envelope viral com uma estrutura de bicamada lipídica e glicoproteínas externas. A camada interna do envelope viral é composta, predominantemente, por proteínas de matriz e a camada externa, maioritariamente, pelo material lipídico derivado do hospedeiro. As glicoproteínas de superfície neuraminidase (NA) e hemaglutinina (HA) surgem como espiões, 10 a 12 nm de comprimento, à superfície das partículas. São estas proteínas de

superfície, particularmente a hemaglutinina, que determinam a especificidade antigénica dos subtipos de influenza.

Epidemias de influenza típicas causam aumentos na incidência de pneumonia e doença das vias respiratórias inferiores, como testemunhado por taxas aumentadas de hospitalização ou mortalidade. Os idosos ou aqueles com doenças crónicas subjacentes são mais susceptíveis de sofrerem tais complicações, mas as crianças de tenra idade também podem sofrer doença grave. Estes grupos em particular, por conseguinte, necessitam de ser protegidos.

As vacinas de influenza actualmente disponíveis são vacinas de influenza inactivadas ou vivas atenuadas. Vacinas da gripe inactivadas compreendem um de três tipos de preparação antigénica: vírus intacto inactivado, subvíriões, onde partículas virais purificadas são dissociadas com detergentes ou outros reagentes para solubilizar o envelope lipídico (denominada vacina "fraccionada") ou HA e NA purificadas (vacina subunitária). Estas vacinas inactivadas são, em geral, proporcionadas intramuscularmente (i.m.).

As vacinas de influenza, de todos os tipos, são habitualmente vacinas trivalentes. As mesmas contêm, em geral, antigénios derivados de duas estirpes de vírus influenza A e uma estirpe de influenza B. Uma dose injectável padrão de 0,5 mL contém, na maioria dos casos, 15 µg de componente antigénico de hemaglutinina de cada estirpe, como medido por imunodifusão radial simples (SRD) (J.M. Wood *et al.*: Uma técnica de imunodifusão radial simples melhorada para o ensaio de antigénio de hemaglutinina de influenza: adaptação para determinação de potência de vacinas de vírus intacto inactivado e subunitárias.

J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood et al., Estudo de colaboração internacional de técnicas de difusão radial simples e imunolectroforese para o ensaio de antigénio de hemaglutinina de vírus influenza. *J. Biol. Stand.* 9 (1981) 317-330).

Em determinadas circunstâncias, tal como a ocorrência de uma estirpe de influenza pandémica, pode ser desejável ter uma vacina que contém apenas uma única estirpe. Isto irá auxiliar a velocidade de resposta a uma situação pandémica.

As estirpes de vírus influenza a serem incorporadas em vacina de influenza são, em cada estação, determinadas pela Organização Mundial de Saúde, em colaboração com autoridades de saúde nacionais e fabricantes de vacinas.

Os esforços actuais para controlar a morbidez e mortalidade associadas a epidemias anuais de influenza são baseados na utilização de vacinas de influenza inactivadas administradas intramuscularmente. A eficácia de tais vacinas na prevenção de doença respiratória e complicações de influenza varia entre 75%, em adultos saudáveis, até menos de 50% nos idosos.

Seria desejável proporcionar uma forma alternativa de administração de vacinas de influenza, em particular uma forma que seja indolor ou menos dolorosa do que a injecção i.m. e não envolva o associado efeito negativo da aceitação pelo doente, devido ao "medo de agulha". Também seria desejável visar o sistema imunitário mediado por célula, por exemplo, através do direcionamento do antigénio para as células dendríticas e células de langerhans que residem na pele, particularmente na derme. A imunidade mediada por célula parece auxiliar com

depuração viral e recuperação de enfermidade e pode proporcionar melhor protecção cruzada entre estirpes de influenza do que anticorpos. Também tem sido descrito na literatura que a administração intradérmica permite a indução de uma imunidade de mucosa ao nível de superfícies de mucosa. Esta oferece um benefício, comparativamente com a via parentérica, para uma vacina contra um patógeno, tal como influenza, onde a porta de entrada do vírus é através da via nasal. Deste modo, as superfícies de mucosa, inicialmente no aparelho respiratório superior, oferecem a primeira linha de defesa.

Além disso, seria desejável reduzir a quantidade de antígeno necessária para uma dose de vacina de influenza. A oferta de vacinas de influenza é, frequentemente, escassa.

A exposição intradérmica experimental de humanos a vacinas de influenza inactivadas data dos anos 40. Embora os benefícios da vacinação intradérmica sejam desde há muito reconhecidos, até à data não tem havido uma visão de consenso de que a vacinação regular para influenza pudesse ser eficaz e praticável por meio da via intradérmica.

Crowe (1965) *Am J Medical Technology* 31, 387-396 descreve um estudo comparando a vacinação intradérmica e subcutânea com uma vacina de influenza fraccionada. Duas doses de 0,1 mL de vacina foram administradas intradermicamente, com 14 dias de intervalo. Os resultados obtidos para distribuição intradérmica não cumpriram os padrões fixados para duas das três estirpes testadas, após uma ou após duas doses.

McElroy (1969) em *New Eng J of Medicine*, 6 de Novembro, página 1076, descreve a administração de uma vacina de estirpe A

monovalente intradermicamente em duas doses e sugere que a via intradérmica possa ser considerada quando a vacina é escassa, e.g., quando surge uma nova estirpe, inesperada.

Tauraso et al. (1969) *Bull Wld Hlth Org* 41, 507-516 descrevem um estudo utilizando vacina de influenza monovalente intacta, inactivada, administrada subcutaneamente (0,25 mL ou 0,5 mL) ou intradermicamente (0,1 mL). Foi proporcionada uma inoculação de reforço. Os resultados sugerem que a distribuição intradérmica é uma alternativa razoável para a distribuição subcutânea, mas os autores sugerem que são necessárias duas doses.

Foy (1970), numa carta para *JAMA*, 6/7/70, vol. 213, página 130, discute uma experiência para testar vacina da gripe administrada intradermicamente, sob provação natural. Foram proporcionadas duas doses de vacina, com intervalo de três a quatro semanas. Os dados aparentemente sugeriram que a vacinação intradérmica preveniu a doença, mas não foram conclusivos.

Numa carta para o *British Medical Journal*, 29/10/77, página 1152, foi descrita uma experiência utilizando uma canhão de jacto para distribuir 0,15 mL de vacina de influenza monovalente intradermicamente, com resultados desfavoráveis. A administração intradérmica foi descrita como requerendo trabalho adicional.

Outros autores salientaram que a injecção intradérmica transporta com ela o risco de derrame, como o faz a injecção subcutânea. Contudo, em virtude do pequeno volume de vacina utilizado na administração intradérmica, o derrame pode resultar em pouca ou nenhuma protecção sendo conferida.

Brooks et al. (1977) *Annals of Allergy* 39, 110-112, descrevem um estudo no qual vacina de influenza morta, contendo duas estirpes A (40 CCA unidades de cada) e separadamente uma estirpe B (100 CCA unidades), foi administrada intradermicamente num volume de 0,1 mL. Os autores concluíram que a via intradérmica era exequível e eficaz para imunização mas que, para determinadas estirpes, podem ser requeridas doses maiores do que podem ser proporcionadas intradermicamente.

Brown et al. (1977) *J Infectious Disease* 136, 466-471, descrevem a administração intradérmica de uma vacina, inactivada por formalina, de estirpe A de influenza monovalente intacta. Foram utilizados 40 CCA num volume de 0,1 mL. Isto foi comparado com administração intramuscular de 0,5 mL (200 CCA). Verificou-se que a resposta à vacinação intradérmica é dependente da idade e mais baixa do que para vacinação i.m. para aquelas com anticorpo preexistente. A conclusão foi de que, com as doses de vacinação utilizadas neste estudo, a vacinação intradérmica deve ser apenas utilizada em circunstâncias especiais.

Halperin et al. (1979) *AJPH* 89, 1247-1252, descrevem uma comparação de vias intradérmica e subcutânea de vacinação de influenza com uma vacina de vírus fraccionada bivalente. Foram utilizados 0,1 mL de vacina contendo 40 CCA de cada estirpe para a vacinação i.d. Herbert e Larke (1979) *J Infectious Diseases* 140, 234-238, descrevem uma comparação de vacinação de influenza intradérmica e subcutânea utilizando uma vacina de vírus intacto bivalente. Verificou-se que a via intradérmica é menos eficaz do que a via subcutânea, onde existiu pouca ou nenhuma exposição anterior à estirpe vacinal. Os autores também não observaram vantagem na menor massa antigénica do inóculo intradérmico em

relação a reactogenicidade, uma vez que esta não pareceu reduzir efeitos secundários da vacina que ocorrem com a imunização subcutânea de dose superior.

Bader (1980), numa carta a *AJPH*, vol. 70 N° 5, discute os resultados de diversos ensaios com distribuição intradérmica de vacina da gripe e suporta o potencial valor da distribuição intradérmica quando duas doses são proporcionadas com duas semanas de intervalo.

Niculescu et al. (1981) em *Arch Roum Path Exp Microbiol*, 40, 67-70, descrevem a administração intradérmica de uma vacina trivalente fraccionada, utilizando um "injector de canhão de jacto". Foram administradas duas doses, com um mês de intervalo. Os autores concluem que este método de administração pode ser utilizado para diminuir a taxa de doença durante epidemia de influenza.

Deste modo, a literatura mostra um interesse em vacinação intradérmica entre os meados dos anos sessenta (ou anteriormente) e o início dos anos 80. Contudo, a visão predominante parece ter sido de que seriam necessárias duas doses de vacina. Além disso, existia uma visão largamente generalizada de que, em virtude da dificuldade de administração e da ausência de certeza de que o baixo volume de vacina se localizasse com êxito na região desejada, a utilização da via de distribuição intradérmica seria apenas considerada quando era requerida vacinação rápida e em massa, e. g., em resposta a uma epidemia disseminada. Interessantemente, desde o início dos anos oitenta, existe pouca menção a vacinação intradérmica de gripe na literatura. Desde o início dos anos oitenta, tem havido pouca menção de vacinação intradérmica de gripe utilizando uma

abordagem de antigénio proteico na literatura. Os esforços em proteína não parecem ter sido muito apreciados e a atenção voltou-se, em vez disso, para a vacinação de ADN. Ver revisão por Webster R.G. (1999) em *Clin Infect Dis*, 28, 225-229 e publicações, tais como Degano et al. (1999) *Vaccine* 18, 623-32; Haensler et al. (1999) *Vaccine* 17, 628-638; Degano et al. (1998) *Vaccine* 16, 394-398.

O documento WO9419013 descreve vacinas de influenza contendo monofosforil-lípido A 3-O-desacilado e processos para a sua preparação.

Chen D et al. *Nature Medicine* 2000 6(10):1187-1190, divulgam a administração de uma vacina de influenza trivalente em pó por injecção de jacto.

O documento US4724146 descreve a preparação de vacinas de herpes simplex utilizando surfactantes, tais como Tween™ 80 e Triton™ X-100.

Vasil'eva RI et al. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii I Immunobiologii* 1987 3:38-42, descrevem a administração de vacinas de influenza bivalentes por injecção de jacto.

O documento WO9815287 divulga composições vacinais compreendendo saponina, tais como QS21 e monofosforil-lípido A 3-O-desacilado.

Halperin W et al. *American Journal of Public Health* 1979 69(12):1247-1256, m a imunogenicidade de vacinas de influenza bivalentes, administradas intradermicamente ou subcutaneamente.

Deste modo, as vacinas de influenza comercialmente disponíveis permanecem as vacinas intramusculares fraccionadas ou subunitárias intramuscularmente administradas. Estas vacinas são preparadas através da disruptão da partícula de vírus, em geral com um solvente orgânico ou um detergente, e separação ou purificação das proteínas virais em extensões variáveis. As vacinas fraccionadas são preparadas por fragmentação de vírus influenza intacto, infeccioso ou inactivado, com concentrações solubilizantes de solventes orgânicos ou detergentes e subsequente remoção do agente solubilizante e algum ou a maioria do material lipídico viral. As vacinas fraccionadas contêm, em geral, proteína de matriz e nucleoproteína contaminantes e, por vezes, lípido, assim como as proteínas de envelope de membrana. As vacinas fraccionadas conterão, habitualmente, a maioria ou a totalidade das proteínas estruturais virais, embora não necessariamente nas mesmas proporções que ocorrem no vírus intacto. As vacinas subunitárias, por outro lado, consistem essencialmente nas proteínas de superfície viral altamente purificadas, hemaglutinina e neuraminidase, que são as proteínas de superfície responsáveis por potenciarem, após vacinação, os anticorpos neutralizantes de vírus desejados. As nucleoproteínas e de matriz são não detectáveis, ou escassamente detectáveis em vacinas subunitárias.

Padrões são aplicados internacionalmente, de modo a medir a eficácia de vacinas de influenza. Os critérios oficiais da União Europeia para uma vacina eficaz contra influenza são expostos na tabela abaixo. Teoricamente, para cumprir os requisitos da União Europeia, uma vacina de influenza tem que cumprir apenas um dos critérios na tabela, para todas as estirpes de influenza incluídas na vacina. Contudo, na prática, pelo menos dois ou, mais provavelmente, todos os três dos critérios terão de ser

cumpridos para todas as estirpes, particularmente para uma nova vacina, tal como uma nova vacina intradérmica. Sob algumas circunstâncias podem ser suficientes dois critérios. Por exemplo, pode ser aceitável que dois dos três critérios sejam cumpridos por todas as estirpes, enquanto o terceiro critério seja cumprido por algumas, mas não todas as estirpes (e. g., duas em três estirpes). Os requisitos são diferentes para populações adultas (18-60 anos) e populações idosas (>60 anos).

	18 - 60 anos	> 60 anos
Taxa de seroconversão*	>40%	>30%
Factor de conversão**	>2,5	>2,0
Taxa de protecção***	>70%	>60%

* Taxa de seroconversão é definida como a percentagem de vacinados que têm, pelo menos, um aumento de 4 vezes em títulos séricos de inibição de hemaglutinina (HI) após vacinação, para cada estirpe vacinal.

** Factor de conversão é definido como o factor de aumento em títulos médios geométricos séricos de HI (GMT) após vacinação, para cada estirpe vacinal.

*** Taxa de protecção é definida como a percentagem de vacinados com um título sérico de HI igual ou superior a 1:40 após vacinação (para cada estirpe vacinal) e é normalmente aceite como indicando protecção.

Para que uma vacina da gripe intradérmica seja comercialmente útil necessitará, não apenas de cumprir aqueles padrões mas também, na prática, necessitará de ser, pelo menos, tão eficaz quanto as vacinas intramusculares actualmente disponíveis. Necessitará também de ser produzida por um processo

aceitável e irá, certamente, necessitar de ser comercialmente viável em termos da quantidade de antigénio e do número de administrações requerido. Além disso, necessitará de ser administrada utilizando um processo que seja fiável e simples para efectuar pelo pessoal médico.

Embora as vacinas da gripe intradérmicas baseadas em vírus inactivados tenham sido estudadas em anos anteriores, o facto de não existir vacina da gripe intradérmica actualmente no mercado, reflecte a dificuldade em alcançar vacinação eficaz por meio desta via.

Foi agora verificado que determinadas vacinas de influenza trivalentes proporcionam vacinas intradérmicas particularmente boas que são comercialmente viáveis. Em particular, uma única administração intradérmica de uma tal preparação vacinal de vírus influenza estimula imunidade sistémica a um nível protector, com uma baixa dose de antigénio. Além disso, os critérios internacionais para uma vacina da gripe eficaz são cumpridos. Mais especificamente, a administração intradérmica da vacina de baixa dose de antigénio pode produzir uma seroconversão sistémica (aumento de 4 vezes em títulos anti-HA) equivalente àquela obtida por administração s.c. da mesma vacina.

Como aqui utilizado, o termo "distribuição intradérmica" significa distribuição da vacina à derme na pele. A derme é a camada na pele, localizada entre cerca de 1,0 e cerca de 2,0 mm a partir da superfície na pele humana, mas existe uma determinada quantidade de variação entre indivíduos e em diferentes partes do corpo. Em geral, pode prever-se atingir a derme através da entrada de 1,5 mm sob a superfície da pele. A

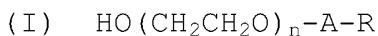
derme está localizada entre o *stratum corneum* e a epiderme à superfície e a camada subcutânea por baixo.

A invenção proporciona, num primeiro aspecto, a utilização de uma preparação trivalente antigénica de influenza fraccionada, proporcionada num dispositivo de distribuição intradérmica de agulha curta, adaptado para limitar a administração a uma localização entre 1,0 e 2,0 mm sob a superfície da pele, na preparação de uma vacina de influenza monodose para distribuição intradérmica. A preparação antigénica de influenza pode ser produzida de acordo com uma variedade de métodos conhecidos incluindo, em particular, métodos aqui descritos.

A vacina trivalente para utilização de acordo com a invenção cumpre alguns ou a totalidade dos critérios da UE para vacinas de influenza, como expostos anteriormente, de modo a que a vacina seja capaz de ser aprovada para comercialização na Europa. De um modo preferido, pelo menos, dois dos três critérios da UE são cumpridos para as ou todas as estirpes de influenza representadas na vacina. De um modo mais preferido, pelo menos, dois critérios são cumpridos para todas as estirpes e o terceiro critério é cumprido por todas as estirpes ou, pelo menos, por todas menos uma das estirpes. De um modo muito preferido, todas as estirpes presentes cumprem a totalidade dos três critérios.

De um modo preferido, a vacina intradérmica aqui descrita comprehende, pelo menos, um surfactante não iónico que pode ser seleccionado do grupo consistindo nos octilfenoxipolioxietanóis ou nonilfenoxipolioxietanóis (por exemplo, a série Triton™ comercialmente disponível), ésteres de polioxietileno sorbitano

(série Tween™) e éteres ou ésteres de polioxietileno, de fórmula geral (I):



na qual n é 1-50, A é uma ligação ou -C(O)-, R é alquiloC₁₋₅₀ ou fenilalquiloC₁₋₅₀; e combinações de dois ou mais destes.

É preferida uma combinação de dois surfactantes não iónicos, um de cada um dos octilfenoxipolioxietanóis e dos ésteres de polioxietileno sorbitano, em particular uma combinação de Tween 80 e Triton X-100. São a seguir discutidas combinações adicionais possíveis e preferidas de detergentes.

A vacina para utilização de acordo com a invenção tem uma quantidade de hemaglutinina mais baixa do que vacinas convencionais e é administrada num volume inferior. De um modo preferido, a quantidade de hemaglutinina por estirpe de influenza é cerca de 1-7,5 µg ou 1-5 µg, de um modo mais preferido, aproximadamente, 3 µg ou, aproximadamente, 5 µg, que é cerca de um quinto ou um terço, respectivamente, da dose de hemaglutinina utilizada em vacinas convencionais para administração intramuscular. São também fortemente preferidos 6 µg de hemaglutinina por estirpe de influenza, deste modo 2-6,5 µg também é uma gama preferida.

De um modo preferido, o volume de uma dose de vacina de acordo com a invenção é entre 0,025 mL e 2,5 mL, de um modo mais preferido, aproximadamente, 0,1 mL ou, aproximadamente, 0,2 mL. Também poderá ser considerado um volume de dose de 50 µL. Uma dose de 0,1 mL é, aproximadamente, um quinto do volume de uma dose convencional de vacina da gripe intramuscular. O volume de

líquido que pode ser administrado intradermicamente depende, em parte, do local da injecção. Por exemplo, para uma injecção na região deltóide, 0,1 mL é o volume máximo preferido, ao passo que na região lombar pode ser proporcionado um grande volume, e.g., cerca de 0,2 mL.

Preparações antigénicas de gripe fraccionadas adequadas para utilização na invenção incluem uma preparação antigénica de influenza, obtenível pelo seguinte processo:

- (i) recolha de material contendo vírus a partir de uma cultura;
- (ii) clarificação do material recolhido, de modo a remover material não viral;
- (iii) concentração do vírus recolhido;
- (iv) uma etapa adicional para separar vírus intacto de material não viral;
- (v) fraccionamento do vírus intacto, utilizando um agente de fraccionamento adequado numa etapa de centrifugação de gradiente de densidade;
- (vi) filtração para remover materiais não desejados;

em que as etapas são realizadas naquela ordem mas não necessariamente consecutivamente.

De um modo preferido, o vírus é cultivado em ovos, de um modo mais particular em ovos de galinha poedeira embrionados, caso em que o material recolhido é fluido alantóico.

De um modo preferido, a etapa de clarificação é realizada por centrifugação, a uma velocidade moderada. Alternativamente, pode ser utilizada uma etapa de filtração, por exemplo, com uma

membrana de 0,2 µm. A etapa de clarificação elimina a maior parte do material derivado de ovo.

De um modo preferido, a etapa de concentração emprega um método de adsorção, de um modo muito preferido, utilizando CaHPO₄. Alternativamente, pode ser utilizada filtração, por exemplo ultrafiltração.

De um modo preferido, a etapa de separação adicional (iv) é uma separação de centrifugação zonal, particularmente uma separação utilizando um gradiente de sacarose. Opcionalmente, o gradiente contém um conservante, de modo a prevenir crescimento microbiano.

De um modo preferido, a etapa de fraccionamento é realizada num gradiente de sacarose adicional, em que o gradiente de sacarose contém o agente de fraccionamento.

De um modo preferido, a etapa de filtração (vi) é uma etapa de ultrafiltração que concentra o material viral fraccionado.

De um modo preferido existe, pelo menos, uma etapa de filtração estéril, opcionalmente no fim do processo.

Opcionalmente, existe uma etapa de inactivação antes da etapa de filtração final.

As vacinas para utilização de acordo com a invenção são administradas a uma localização entre cerca de 1,0 mm e 2,0 mm sob a superfície da pele. De um modo mais preferido, a vacina é distribuída a uma distância de cerca de 1,5 mm sob a superfície da pele.

A vacina para utilização de acordo com a invenção é uma vacina de virião fraccionada compreendendo partículas. De um modo preferido, a vacina contém partículas tendo um tamanho médio de partícula inferior a 200 nm, de um modo mais preferido entre 50 e 180 nm, de um modo muito preferido entre 100 e 150 nm, como medido utilizando um método de dispersão de luz dinâmico (*Malvern Zeta Sizer*). O tamanho de partícula pode variar de sessão para sessão, dependendo das estirpes.

Surfactantes preferidos abrangidos pela presente fórmula (I) são moléculas em que n é 4-24, de um modo mais preferido 6-12 e, de um modo muito preferido 9; o componente R é C₁₋₅₀, de um modo preferido alquiloC_{4-C₂₀} e, de um modo muito preferido, alquiloC₁₂.

Octilfenoxipolioxietanóis e ésteres de polioxietileno sorbitano são descritos em "Surfactant systems" Eds: Attwood and Florence (1983, Chapman and Hall). Octilfenoxipolioxietanóis (os octoxinóis), incluindo t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100™) também são descritos na Entrada 6858 do Índice Merck (Página 1162, 12^a Edição, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., EUA; ISBN 0911910-12-3). Os ésteres de polioxietileno sorbitano, incluindo monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80™) são descritos na Entrada 7742 do Índice Merck (Página 1308, 12^a Edição, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., EUA; ISBN 0911910-12-3). Ambos podem ser preparados utilizando métodos aí descritos, ou adquiridos a partir de fontes comerciais, tal como Sigma Inc.

Surfactantes não iônicos particularmente preferidos incluem Triton X-45, t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100), Triton X-102, Triton X-114, Triton X-165, Triton X-205, Triton X-305,

Triton N-57, Triton N-101, Triton N-128, Breij 35, éter de polioxietileno-9-laurilo (*laureth* 9) e éter de polioxietileno-9-estearilo (*steareth* 9). São particularmente preferidos Triton X-100 e *laureth* 9. Também é particularmente preferido o éster de polioxietileno sorbitano, monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80TM).

Éteres de polioxietileno adicionalmente adequados de fórmula geral (I) são seleccionados do seguinte grupo: éter de polioxietileno-8-estearilo, éter de polioxietileno-4-laurilo, éter de polioxietileno-35-laurilo e éter de polioxietileno-23-laurilo.

Termos ou nomes alternativos para éter de laurilo de polioxietileno são divulgados no registo CAS. O número de registo CAS de éter de polioxietileno-9 laurilo é: 9002-92-0. Éteres de polioxietileno, tal como éter de laurilo de polioxietileno, são descritos no índice Merck (12^a ed: entrada 7717, *Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., EUA; ISBN 0911910-12-3*). O *laureth* 9 é formado através da reacção de óxido de etileno com álcool dodecílico e tem uma média de nove unidades de óxido de etileno.

A razão do comprimento da secção de polioxietileno para o comprimento da cadeia de alquilo no surfactante (*i. e.*, a razão de n: comprimento de cadeia de alquilo), afecta a solubilidade desta classe de surfactante num meio aquoso. Deste modo, os surfactantes da presente invenção podem estar em solução ou podem formar estruturas particuladas, tais como micelas ou vesículas. Como uma solução, os surfactantes da presente invenção são seguros, facilmente esterilizáveis, simples de administrar e podem ser preparações num modo simples, sem os

problemas de GMP e QC associados à formação de estruturas particuladas uniformes. Alguns éteres de polioxietileno, tal como laureth 9, são capazes de formarem soluções não vesiculares. Contudo, o éter de polioxietileno-8 palmitoílo ($C_{18}E_8$) é capaz de formar vesículas. Consequentemente, vesículas de éter de polioxietileno-8 palmitoílo em combinação com, pelo menos, um surfactante não iônico adicional, podem ser empregues nas formulações da presente invenção.

De um modo preferido, o éter de polioxietileno utilizado nas formulações da presente invenção tem actividade hemolítica. A actividade hemolítica de um éter de polioxietileno pode ser medida *in vitro*, fazendo referência ao ensaio seguinte, e é como expressa como a concentração mais elevada do surfactante que não causa lise dos glóbulos vermelhos:

1. Sangue fresco de porquinhos-da-índia é lavado com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 3 vezes numa centrífuga de bancada. Após ressuspensão para o volume original, o sangue é adicionalmente diluído 10 vezes em PBS.
2. 50 μ L desta suspensão de sangue são adicionados a 800 μ L de PBS contendo diluições duplas de detergente.
3. Após 8 horas, a hemólise é avaliada visualmente ou através da medição da densidade óptica do sobrenadante. A presença de um sobrenadante vermelho, que absorve luz a 570 nm, indica a presença de hemólise.
4. Os resultados são expressos como a concentração da primeira diluição de detergente à qual a hemólise já não ocorre.

Dentro da variabilidade experimental inerente de um tal ensaio biológico, os éteres de polioxietileno, ou surfactantes de fórmula geral (I), da presente invenção têm, de um modo preferido, uma actividade hemolítica de, aproximadamente, entre 0,5-0,0001%, de um modo mais preferido entre 0,05-0,0001%, de um modo ainda mais preferido entre 0,005-0,0001% e, de um modo muito preferido, entre 0,003-0,0004%. Idealmente, os referidos éteres ou ésteres de polioxietileno devem ter uma actividade hemolítica semelhante (*i. e.*, dentro de uma diferença de dez vezes) àquela quer de éter de polioxietileno-9 laurilo ou éter de polioxietileno-8 estearilo.

Dois ou mais surfactantes não iónicos dos diferentes grupos de surfactantes descritos podem estar presentes na formulação vacinal aqui descrita. Em particular, é preferida uma combinação de um éster de polioxietileno sorbitano, tal como monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80TM) e um octoxinol, tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton) X-100TM. Outra combinação particularmente preferida de surfactantes não iónicos compreende laureth 9 mais um éster de polioxietileno sorbitano, ou um octoxinol, ou ambos.

De um modo preferido, o, ou cada, surfactante não iónico está presente na formulação vacinal final a uma concentração compreendida entre 0,001 e 20%, de um modo mais preferido 0,01 e 10% e, de um modo muito preferido, até cerca de 2% (p/v). Se um ou dois surfactantes estiverem presentes, estes estão, em geral, presentes na formulação final a uma concentração de até cerca de 2% cada, tipicamente a uma concentração de até cerca de 0,6% cada. Um ou mais surfactantes adicionais podem estar presentes, em geral, até uma concentração de cerca de 1% cada e, tipicamente, em vestígios até cerca de 0,2% ou 0,1% cada.

Qualquer mistura de surfactantes pode estar presente nas formulações vacinais de acordo com a invenção.

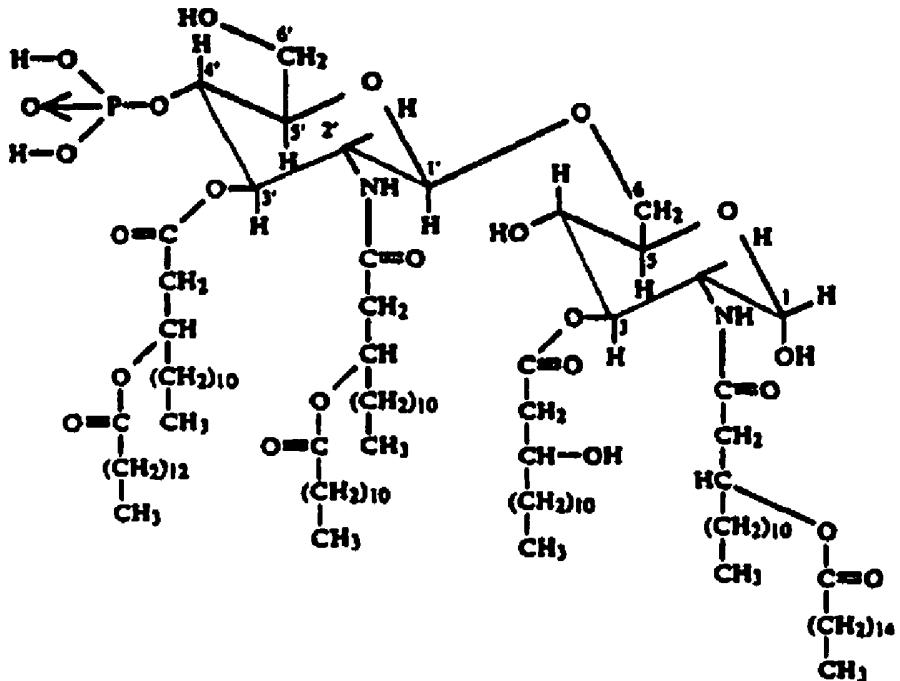
Surfactantes não iônicos, tal como aqueles discutidos acima, têm concentrações preferidas na composição vacinal final como se segue: ésteres de polioxietileno sorbitano, tal como Tween 80™: 0,01 a 1%, de um modo muito preferido cerca de 0,1% (p/v); octilfenoxipolioxietanóis ou nonilfenoxipolioxietanóis, tal como Triton X-100™ ou outros detergentes na série Triton: 0,001 a 0,1%, de um modo muito preferido 0,005 a 0,02% (p/v); éteres de polioxietileno de fórmula geral (I), tal como laureth 9: 0,1 a 20%, de um modo preferido 0,1 a 10% e, de um modo muito preferido, 0,1 a 1% ou cerca de 0,5% (p/v).

Outros reagentes também podem estar presentes na formulação. Como tal, as formulações para utilização de acordo com a presente invenção também podem compreender um ácido biliar ou um seu derivado, em particular na forma de um sal. Estes incluem derivados de ácido cólico e sais destes, em particular sais de sódio de ácido cólico ou derivados de ácido cólico. Exemplos de ácidos biliares e derivados deste incluem ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido cenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hidodesoxicólico e derivados, tais como glico-, tauro-, amidopropil-1-propanossulfónico-, amidopropil-2-hidroxi-1-propanossulfônico derivados dos ácidos biliares supramencionados, ou N,N-bis (3Dgluconoamidopropil) desoxicolamida. Um exemplo particularmente preferido é o desoxicolato de sódio (NaDOC) que pode estar presente na dose vacinal final.

A formulação vacinal para utilização de acordo com a invenção compreende, de um modo preferido, uma preparação de vírus da gripe fraccionada, em combinação com um ou mais surfactantes não iónicos. Os um ou mais surfactantes não iónicos podem ser residuais do processo pelo qual é produzida a preparação antigénica de gripe fraccionada e/ou adicionados à preparação antigénica mais tarde. A concentração do ou de cada surfactante não iónico pode ser ajustada para o nível desejado no fim do processo de fraccionamento/purificação. Pensa-se que o material antigénico de gripe fraccionado possa ser estabilizado na presença de um surfactante não iónico, embora se compreenda que a invenção não depende de ser este necessariamente o caso.

A vacina para utilização de acordo com a invenção pode adicionalmente compreender um adjuvante ou imunoestimulante, tais como mas não limitados a lípido A destoxificado de qualquer fonte e derivados não tóxicos de lípido A, saponinas e outros reagentes capazes de estimularem uma resposta de tipo TH1.

Sabe-se desde há muito que o lipopolissacárido (LPS) enterobacteriano é um potente estimulador do sistema imunitário, embora a sua utilização em adjuvantes tenha sido restringida pelos seus efeitos tóxicos. Um derivado não tóxico de LPS, monofosforil-lípido A (MPL), produzido por remoção do grupo de hidrato de carbono nuclear e do fosfato da glucosamina da extremidade de redução, foi descrito por Ribi *et al.* (1986, *Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419) e tem a seguinte estrutura:



Uma versão destoxicificada adicional de MPL resulta da remoção da cadeia acilo da posição 3 da estrutura de dissacárido e é denominado monofosforil-lípido A 3-O-Desacilado (3D-MPL). Pode ser purificado e preparado pelos métodos ensinados no documento GB 2122204B, cuja referência também divulga a preparação de lípido A difosforilo e variantes 3-O-desacilados destes.

Uma forma preferida de 3D-MPL é na forma de uma emulsão tendo um pequeno tamanho de partícula, inferior a 0,2 µm em diâmetro, e seu método de preparação é divulgado no documento WO 94/21292. Formulações aquosas compreendendo monofosforil-lípido A e um surfactante foram descritos no documento WO9843670A2.

Os adjuvantes derivados de lipopolissacárido a serem formulados nas composições para utilização de acordo com a

presente invenção podem ser purificados e processados a partir de fontes bacterianas ou, alternativamente, os mesmos podem ser sintéticos. Por exemplo, monofosforil-lípido A purificado é descrito em Ribi *et al.* 1986 (*supra*) e monofosforilo ou difosforilo lípido A 3-O-Desacilado derivado de *Salmonella sp.* é descrito nos documentos GB 2220211 e US 4912094. Outros lipopolissacáridos purificados e sintéticos foram descritos (Hilgers *et al.*, 1986, *Int.Arch.Allergy.Immunol.*, 79(4):392-6; Hilgers *et al.*, 1987, *Immunology*, 60(1):141-6; e documento EP 0549074 B1). Um adjuvante de lipopolissacárido bacteriano particularmente preferido é 3D-MPL.

Consequentemente, os derivados de LPS que podem ser utilizados na presente invenção são aqueles imunoestimulantes que são semelhantes em estrutura àqueles de LPS ou MPL ou 3D-MPL. Noutro aspecto, os derivados de LPS podem ser um monossacárido acilado que é uma subporção da anterior estrutura de MPL.

As saponinas são ensinadas em: Lacaille-Dubois, M e Wagner H. (1996. Uma revisão das actividades biológicas e farmacológicas de saponinas. *Phytomedicine*, vol 2, p. 363-386). As saponinas são esteróides ou glicósidos de triterpeno largamente distribuídos nos reinos vegetal e animal marinho. As saponinas são notadas por formarem soluções coloidais em água, que espumam em agitação, e para precipitação de colesterol. Quando as saponinas estão próximo de membranas celulares, as mesmas criam estruturas semelhantes a poros na membrana que fazem com que a membrana rebente. A hemólise de eritrócitos é um exemplo deste fenómeno, que é uma propriedade de determinadas, mas não todas, saponinas.

As saponinas são conhecidas como adjuvantes em vacinas para administração sistémica. A actividade adjuvante e hemolítica de saponinas individuais tem sido extensamente estudada na técnica (Lacaille-Dubois e Wagner, *supra*). Por exemplo, Quil A (derivado da casca da árvore Sul Americana *Quillaja Saponaria Molina*), e suas fracções, são descritos no documento US 5057540 e "Saponinas como adjuvantes vacinais", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55; e documento EP 0362279 B1. Estruturas particuladas, designados Complexos Estimulantes Imunitários (ISCOMS), compreendendo fracções de Quil A são hemolíticos e têm sido utilizados na preparação de vacinas (Morein, B., documentos EP 0109942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). As saponinas hemolíticas QS21 e QS17 (fracções purificadas por HPLC de Quil A) têm sido descritas como potentes adjuvantes sistémicos e o método da sua produção é divulgado nas Patentes US N° 5057540 e EP 0362279 B1. Outras saponinas que têm sido utilizadas em estudos de vacinação sistémica incluem aquelas derivadas de outras espécies de plantas, tais como *Gypsophila* e *Saponaria* (Bomford et al., *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992).

Um sistema melhorado envolve a combinação de um derivado de lípido A não tóxico e um derivado de saponina, particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL, como divulgado no documento WO 94/00153, ou uma composição menos reactogénica, onde QS21 é atenuado com colesterol, como divulgado no documento WO 96/33739.

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

Consequentemente, é descrita uma vacina compreendendo uma preparação antigénica de influenza da presente invenção, adjuvanteada com lípido A destoxificado ou um derivado não tóxico de lípido A, de um modo mais preferido adjuvanteada com um monofosforilo lípido A ou seu derivado.

De um modo preferido, a vacina compreende, adicionalmente, uma saponina, de um modo mais preferido QS21.

De um modo preferido, a formulação compreende, adicionalmente, uma emulsão de óleo em água. A presente invenção também descreve um método para produção de uma formulação vacinal, compreendendo misturar uma preparação antigénica para utilização de acordo com a presente invenção, juntamente com um excipiente farmaceuticamente aceitável, tal como 3D-MPL.

Componentes adicionais que estão presentes, de um modo preferido, numa formulação vacinal adjuvanteada para utilização de acordo com a invenção incluem detergentes não iónicos, tais como os ésteres de octoxinóis e polioxietileno, como aqui se descrevem, particularmente t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) e monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80); e derivados de sais biliares ou ácido cólico, como aqui se descrevem, em particular desoxicolato de sódio ou taurodesoxicolato. Deste modo, uma formulação particularmente preferida compreende 3D-MPL, Triton X-100, Tween 80 e desoxicolato de sódio, que podem ser combinados com uma preparação antigénica de vírus influenza, de modo a proporcionar uma vacina adequada para aplicação intradérmica.

A vacina de influenza intradérmica pode compreender uma formulação compreendendo adjuvante vesicular. A este respeito, a

formulação de adjuvante preferida compreende uma vesícula unilamelar compreendendo colesterol, tendo uma bicamada lipídica compreendendo, de um modo preferido, dioleoil fosfatidilcolina, em que a saponina e o derivado de LPS estão associados a, ou embutidos dentro, da bicamada lipídica. De um modo mais preferido, estas formulações de adjuvante compreendem QS21 como a saponina e 3D-MPL como o derivado de LPS, em que a razão de QS21:colesterol é de 1:1 a 1:100, peso/peso e, de um modo muito preferido, 1:5, peso/peso. Tais formulações de adjuvante são descritas no documento EP 0822831 B.

A invenção também proporciona uma preparação antigénica de influenza fraccionada trivalente, proporcionada num dispositivo de distribuição intradérmica de agulha curta, adaptado para limitar a administração a uma localização entre 1,0 e 2,0 mm sob a superfície da pele, para utilização como uma vacina de influenza intradérmica monodose.

A invenção proporciona, num aspecto adicional, um kit farmacêutico compreendendo um dispositivo de administração intradérmica de agulha curta, adaptado para limitar a administração a uma localização entre 1,0 mm e 2,0 mm sob a superfície da pele e uma formulação vacinal como aqui se descreve. O dispositivo é, de um modo preferido, proporcionado já cheio com a vacina. De um modo preferido, a vacina é num volume líquido mais pequeno do que para vacinas intramusculares convencionais, como aqui se descrevem, particularmente um volume compreendido entre cerca de 0,05 mL e 0,2 mL.

Dispositivos adequados para utilização com as vacinas intradérmicas aqui descritas incluem dispositivos de agulha curta, tais como aqueles descritos nos documentos US 4886499,

US5190521, US 5328483, US 5527288, US 4270537, US 5015235, US 5141496, US 5417662. Vacinas intradérmicas também podem ser administradas por dispositivos que limitam o comprimento de penetração eficaz de uma agulha dentro da pele, tais como aqueles descritos no documento WO99/34850 e seus equivalentes funcionais.

A vacina de influenza para utilização de acordo com a invenção é uma vacina de influenza trivalente compreendendo, em geral, três estirpes de influenza, embora possa conter mais de três estirpes. Vacinas de influenza convencionais compreendem três estirpes de influenza, duas estirpes A e uma estirpe B.

As preparações de vírus influenza podem ser derivadas do método do ovo embrionado convencional, ou as mesmas podem ser derivadas de qualquer dos métodos de nova geração, utilizando cultura de tecidos para cultivar o vírus. Substratos celulares adequados para cultivar o vírus incluem, por exemplo, células de rim de cão, tais como MDCK ou células de um clone de MDCK, células semelhantes a MDCK, células de rim de macaco, tal como células de AGMK, incluindo células Vero, ou qualquer outro tipo de célula de mamífero adequada para a produção de vírus influenza para efeitos vacinais. Substratos celulares adequados também incluem células humanas, e. g., células MRC-5. Substratos celulares adequados não estão limitados a linhas celulares; por exemplo células primárias, tal como fibroblastos de embrião de galinha, também estão incluídas.

Tradicionalmente, a gripe fraccionada era produzida utilizando um tratamento de solvente/detergente, tal como fosfato de tri-*n*-butilo, ou éter dietílico em combinação com Tween™ (conhecido como fraccionamento "Tween-éter") e este

processo ainda é utilizado em algumas instalações de produção. Outros agentes de fraccionamento agora empregues incluem detergentes ou enzimas proteolíticas ou sais biliares, por exemplo desoxicolato de sódio, como descrito na patente N° DD 155875. Detergentes que podem ser utilizados como agentes de fraccionamento incluem detergentes catiónicos, e. g., brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), outros detergentes iónicos, e. g., laurilssulato, taurodesoxicolato ou detergentes não iónicos, tais como aqueles descritos anteriormente, incluindo Triton X-100 (por exemplo, num processo descrito em Lina *et al.*, 2000, *Biologicals* 28, 95-103) e Triton N-101, ou combinações de quaisquer dois ou mais detergentes.

Agentes de fraccionamento adequados adicionais que podem ser utilizados para produzir preparações de vírus de gripe fraccionadas incluem:

1. Ácidos biliares e derivados destes, incluindo: ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido cenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico e derivados, como glico-, tauro-, amidopropil-1-propanossulfónico-, amidopropil-2-hidroxi-1-propanossulfónico derivados dos ácidos biliares supramencionados, ou N,N-bis (3Dgluconoamidopropil) desoxicolamida. Um exemplo particular é o desoxicolato de sódio (NaDOC) que pode estar presente em quantidades vestigiais na dose vacinal final.

2. Alquilglicósidos ou alquiltioglicósidos, onde a cadeia alquilo está entre C6 - C18, tipicamente entre C8 e C14, a fracção de açúcar é qualquer pentose ou hexose, ou suas combinações, com diferentes ligações, como 1->6, 1->5,

1->4, 1->3, 1-2. A cadeia alquilo pode ser saturada, insaturada e/ou ramificada.

3. Derivados de 2 anterior, onde um ou mais grupos hidroxilo, de um modo preferido o grupo hidroxilo 6 é/são modificados, como ésteres, etoxilatos, sulfatos, éteres, carbonatos, sulfosuccinatos, isetionatos, etercarboxilatos, compostos quaternários de amónio.

4. Açúcares de acilo, onde a cadeia acilo é entre C6 e C18, tipicamente entre C8 e C12, fracção de açúcar é qualquer pentose ou hexose, ou suas combinações, com diferentes ligações, como 1->6, 1->5, 1->4, 1->3, 1-2. A cadeia acilo pode ser saturada ou insaturada e/ou ramificada, cíclica ou não cíclica, com ou sem um ou mais heteroátomos, e. g., N, S, P ou O.

5. Sulfobetaínas de estrutura R-N,N-(R₁,R₂)-3-amino-1-propanossulfonato, onde R é qualquer cadeia alquilo ou cadeia arilalquilo entre C6 e C18, tipicamente entre C8 e C16. A cadeia alquilo R pode ser saturada, insaturada e/ou ramificada. R₁ e R₂ são, de um modo preferido, cadeias alquilo entre C1 e C4, tipicamente C1 ou R₁, R₂ pode formar um anel heterocíclico juntamente com o azoto.

6. Betaínas de estrutura R-N,N-(R₁,R₂)-glicina, onde R é qualquer cadeia alquilo entre C6 e C18, tipicamente entre C8 e C16. A cadeia alquilo pode ser saturada, insaturada e/ou ramificada. R₁ e R₂ são, de um modo preferido, cadeias alquilo entre C1 e C4, tipicamente C1 ou R₁ e R₂ pode formar um anel heterocíclico juntamente com o azoto.

7. N,N-dialquil-glucamidas, de estrutura R-(N-R1)-glucamida, onde R é qualquer cadeia alquilo entre C6 e C18, tipicamente entre C8 e C12. A cadeia alquilo pode ser saturada, insaturada e/ou ramificada ou cíclica. R1 e R2 são cadeias alquilo entre C1 e C6, tipicamente C1. A fracção de açúcar poderá ser modificada com pentoses ou hexoses.

8. Compostos quaternários de amónio de estrutura R, -N⁺ (-R1, -R2, -R3), onde R é qualquer cadeia alquilo entre C6 e C20, tipicamente C20. A cadeia alquilo pode ser saturada, insaturada e/ou ramificada. R1, R2 e R3 são, de um modo preferido, cadeias alquilo entre C1 e C4, tipicamente C1 ou R1, R2 pode formar um anel heterocíclico juntamente com o azoto. Um exemplo particular é brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB).

O processo de preparação para uma vacina fraccionada irá incluir um número de diferentes etapas de filtração e/ou outras separações, tais como ultracentrifugação, ultrafiltração, centrifugação zonal e etapas de cromatografia (e. g., permuta iónica) numa variedade de combinações e, opcionalmente, uma etapa de inactivação, e. g., com formaldeído ou β-propiolactona ou U.V. que pode ser efectuada antes ou após fraccionamento. O processo de fraccionamento pode ser efectuado como um processo descontínuo, contínuo ou semicontínuo.

De um modo preferido, um sal biliar, tal como desoxicolato de sódio, está presente em quantidades vestigiais numa formulação vacinal fraccionada de acordo com a invenção, de um modo preferido a uma concentração não superior a 0,05%, ou não

superior a cerca de 0,01%, de um modo mais preferido a cerca de 0,0045% (p/v).

Preparações antigénicas de vacina da gripe fraccionada preferidas para utilização de acordo com a invenção compreendem uma quantidade residual de Tween 80 e/ou Triton X-100 restando do processo de produção, embora estes possam ser adicionados ou as suas concentrações ajustadas após preparação do antigénio fraccionado. De um modo preferido tanto Tween 80 como Triton X-100 estão presentes. As gamas preferidas para as concentrações finais destes surfactantes não iónicos na dose vacinal são:

Tween 80: 0,01 a 1%, de um modo mais preferido cerca de 0,1% (v/v)

Triton X-100: 0,001 a 0,1 (p/v, em %), de um modo mais preferido 0,005 a 0,02% (p/v).

Verificou-se que a presença da combinação destes dois surfactantes, em concentrações baixas, promove a estabilidade do antigénio em solução. É possível que esta estabilidade melhorada tornasse o antigénio mais imunogénico intradermicamente do que o têm sido formulações anteriores. Um tal melhoramento poderia surgir de uma prevalência de pequenos agregados antigénicos ou do melhoramento da conformação nativa do antigénio. Será entendido que a invenção não depende de esta explicação teórica estar correcta.

A preparação viral fraccionada preferida também pode conter laureth 9, de um modo preferido na gama 0,1 a 20%, de um modo mais preferido 0,1 a 10% e, de um modo muito preferido, 0,1 a 1% (p/v).

As vacinas para utilização de acordo com a invenção contêm, em geral, não mais de 25% (p/v) de detergente ou surfactante, de um modo preferido inferior a 15% e, de um modo muito preferido, não mais de cerca de 2%.

Os processos para produção de vacinas de gripe inactivadas injectadas convencionais são bem conhecidos e descritos na literatura. Tais processos podem ser modificados para produção de uma vacina intradérmica monodose para utilização na presente invenção, por exemplo pela inclusão de uma etapa para ajustar a concentração de outros componentes, *e. g.*, surfactantes não iónicos, para uma % (p/v) adequada para uma vacina intradérmica para utilização de acordo com a invenção. Contudo, o ingrediente activo da vacina, *i. e.*, o antigénio de influenza pode ser essencialmente o mesmo para a vacina intramuscular convencional e as vacinas intradérmicas monodose de acordo com a invenção.

De um modo preferido, as formulações vacinais para utilização de acordo com a invenção não incluem formulações que não cumprem, pelo menos, dois dos critérios da EU para todas as estirpes, quando administradas como vacina monodose.

A invenção será, agora, adicionalmente descrita nos exemplos seguintes, não limitativos.

EXEMPLOS

Exemplo 1- Preparação de vacina de influenza fraccionada

(Exemplo ilustrativo)

Cada estirpe para a vacina fraccionada foi preparada de acordo com o seguinte processo.

Preparação de inóculo de vírus

No dia de inoculação de ovos embrionados é preparado um inóculo fresco, através da mistura do lote de sementeira de trabalho com uma solução salina tamponada com fosfatos, contendo sulfato de gentamicina a 0,5 mg/mL e hidrocortisona a 25 µg/mL. (dependente de estirpe de vírus). O inóculo de vírus é mantido a 2-8 °C.

Inoculação de ovos embrionados

São utilizados ovos embrionados com nove a onze dias de idade para replicação de vírus. As cascas são descontaminadas. Os ovos são inoculados com 0,2 mL do inóculo de vírus. Os ovos inoculados são incubados, à temperatura apropriada (dependente de estirpe de vírus), durante 48 a 96 horas. No final do período de incubação, os embriões são mortos através de arrefecimento e os ovos são armazenados, durante 12-60 horas, a 2-8 °C.

Recolha

O fluido alantóico dos ovos embrionados arrefecidos é recolhido. Habitualmente, são recolhidos 8 a 10 mL de fluido alantóico em bruto por ovo. Ao volume de vírus monovalente em bruto é, opcionalmente, adicionado tiomersal a 0,100 mg/mL.

Concentração e purificação de vírus intacto de fluido alantóico

1. Clarificação

O fluido alantóico recolhido é clarificado por centrifugação de velocidade moderada (gama: 4000 - 14000 g).

2. Etapa de adsorção

De modo a obter-se um gel de CaHPO₄ no agregado de vírus clarificado, são adicionadas soluções de Na₂HPO₄ a 0,5 mol/L e CaCl₂ a 0,5 mol/L para se atingir uma concentração final de CaHPO₄ de 1,5 g a 3,5 g de CaHPO₄/litro, dependendo da estirpe de vírus.

Após sedimentação durante, pelo menos, 8 horas, o sobrenadante é removido e o sedimento contendo o vírus influenza é ressolvabilizado por adição de uma solução de EDTA-Na₂ a 0,26 mol/L, dependente da quantidade de CaHPO₄ utilizada.

3. Filtração

O sedimento ressuspenso é filtrado numa membrana filtrante de 6 µm.

4. Centrifugação de gradiente de sacarose

O vírus influenza é concentrado por centrifugação isopícnica num gradiente linear de sacarose (0 - 55% (p/v)), contendo Tiomersal a 100 µg/mL. O caudal é 8 - 15 litros/hora.

No final da centrifugação, o conteúdo do rotor é recuperado em quatro fracções diferentes (a sacarose é medida num refractómetro) :

- fracção 1 55-52% de sacarose
- fracção 2 aproximadamente 52-38% de sacarose
- fracção 3 38-20% de sacarose*
- fracção 4 20-0% de sacarose

* dependente de estirpe de vírus: a fracção 3 pode ser reduzida para 15% de sacarose.

Para preparação vacinal adicional, são utilizadas apenas as fracções 2 e 3.

A fracção 3 é lavada por diafiltração com tampão de fosfatos, com o fim de reduzir o teor de sacarose para, aproximadamente, abaixo de 6%. O vírus influenza presente nesta

fracção diluída é sedimentado, de modo a remover contaminantes solúveis.

O sedimento é ressuspenso e exaustivamente misturado, de modo a obter-se uma suspensão homogénea. A fracção 2 e o sedimento ressuspenso da fracção 3 são agregados e é adicionado tampão de fosfatos, de modo a obter-se um volume de, aproximadamente, 40 litros. Este produto é o concentrado de vírus intacto monovalente.

5. Centrifugação de gradiente de sacarose com desoxicolato de sódio

O concentrado de vírus influenza intacto monovalente é aplicado a uma ultracentrífuga *ENI-Mark II*. O rotor K3 contém um gradiente linear de sacarose (0 - 55% (p/v)), onde é adicionalmente revestido um gradiente de desoxicolato de sódio. Tween 80 está presente durante o fraccionamento até 0,1% (p/v). A concentração máxima de desoxicolato de sódio é 0,7-1,5% (p/v) e é dependente de estirpe. O caudal é 8 -15 litros/hora.

No final da centrifugação, o conteúdo do rotor é recuperado em três fracções diferentes (a sacarose é medida num refractómetro). A fracção 2 é utilizada para processamento adicional. O teor de sacarose para limites de fracção (47-18%) varia de acordo com as estirpes e é fixado após avaliação:

6. Filtração estéril

A fracção de vírus fraccionado é filtrada em membranas filtrantes, terminando com uma membrana de 0,2 µm. Tampão de fosfatos contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 é utilizado para diluição. O volume final da fracção filtrada é 2 a 5 vezes o volume de fracção original.

7. Inactivação

O material monovalente filtrado é incubado a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante, no máximo 84 horas (dependente das estirpes de vírus, esta incubação pode ser encurtada). Tampão de fosfatos contendo Tween 80 a 0,025% é, depois, adicionado, com o fim de reduzir o teor de proteína total para um máx. de 250 µg/mL. É adicionado formaldeído para uma concentração final de 50 µg/mL e a inactivação ocorre a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante, pelo menos, 72 horas.

8. Ultrafiltração

O material de vírus fraccionado inactivado é concentrado, pelo menos, 2 vezes numa unidade de ultrafiltração, equipada com membranas de acetato de celulose com MWCO de 20 kDa. O Material é subsequentemente lavado com tampão de fosfatos contendo Tween 80 a 0,025% (p/v) e seguindo com solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween a 0,01% (p/v).

9. Filtração estéril final

O material após ultrafiltração é filtrado em membranas filtrantes, terminando com uma membrana de 0,2 µm. A concentração final de Hemaglutinina, medida por SRD (método recomendado pela WHO) deve exceder 450 µg/mL.

10. Armazenamento

O volume final monovalente é armazenado a 2 - 8 °C durante um máximo de 18 meses.

Pureza

A pureza foi determinada semiquantitativamente, por rastreio de O.D. de géis de poliacrilamida corados com Coomassie. Os máximos foram determinados manualmente. Resultados de amostras são proporcionados na Tabela 1.

Tabela 1

% de Proteínas Virais (HA, NP, M)					% de outras proteínas virais e derivadas de célula hospedeira
H3N2	Dímero HA	HA1 + 2	NP	M	
A/Syd/5/97	10,34	22,34	25,16	37,33	4,83
A/Nan933/95	8,17	15,8	40,09	30,62	5,32
B					
B/Har/7/94	5,71 ²	24,07	15,64	50	4,58

(continuação)

% de Proteínas Virais (HA, NP, M)					% de outras proteínas virais e derivadas de célula hospedeira
H3N2	Dímero HA	HA1 + 2	NP	M	
B/Yam/166/98	0,68	27,62	21,48	46,02	4,2
H1N1					
A/Tex/36/91		33,42	24,46	34,33	7,79
A/Bei/262/95		32,73	35,72	27,06	4,49
H2N2					
A/sing/1/57	2,8	39,7	21,78	32,12	3,6

Uma particular combinação de estirpes inclui A/Nova Caledónia/20/99 (H1N1), A/Panamá/20/99 (H3N2) e B/Yamanashi/166/98.

Exemplo 2 – Preparação de doses vacinais a partir de volume de vacina (Exemplo ilustrativo)

A vacina final é preparada através da formulação de uma vacina trivalente a partir dos volumes monovalentes, com as concentrações de detergente ajustadas como requerido.

PBS, pH 7,2+/-0,2, Tween 80 e Triton X-100 são misturados de modo a obter as concentrações finais requeridas (PBS 1x concentrado, Tween 80 a 0,15% e Triton X-100 a 0,02%).

Os três vírus fracionados inactivados seguintes são adicionados com 10 minutos de agitação intermédia: 15 µg de A/Nova Caledónia/20/99 (H1N1)

15 µg de A/Panamá/20/99 (H3N2)

15 µg de B/Yamanashi/166/98

Após 15 minutos de agitação, o pH é ajustado para 7,2+/-0,2.

O volume de dose é 500 µL. As doses são enchidas em ampolas estéreis. Imediatamente antes da aplicação da vacina, doses de 0,1 mL são removidas da ampola utilizando o dispositivo para aplicação intradérmica.

Exemplo 3 - Métodos utilizados para medir respostas de anticorpo (Exemplo ilustrativo)

1. Detecção de IgA total e específica de anti-Gripe em secreções nasais humanas por ELISA

Método de recolha para secreções nasais humanas

É utilizado um método apropriado para recolher secreções nasais, por exemplo um método de lavagem nasal clássico ou um método de mecha nasal.

Após recolha e tratamento de secreções nasais humanas, a detecção de IgA total e específica de anti-GRIPE é realizada com ELISA, e. g.:

ELISA de captura para detecção de IgA total

IgA total são capturadas com Ig polyclonal anti-IgA humana purificada por afinidade, imobilizada sobre placas de microtitulação e subsequentemente detectadas utilizando uma Ig polyclonal anti-IgA humana diferente purificada por afinidade ligada a peroxidase.

sIgA humana purificada é utilizada como um padrão, de modo a permitir a quantificação de sIgA nas secreções nasais recolhidas.

Neste ensaio, 3 referências de sIgA humana purificada são utilizadas como referências baixa, média e elevada.

ELISA directo para detecção de IgA específica de anti-GRIPE

São realizados três ELISA diferentes, um em cada estirpe de GRIPE presente na formulação vacinal.

IgA específicas de anti-GRIPE são capturadas com antigénios de GRIPE inactivados fraccionados, revestidos sobre placas de microtitulação e subsequentemente detectados utilizando a mesma Ig anti-IgA humana polyclonal purificada por afinidade, ligada a peroxidase, diferente da utilizada para o ELISA de IgA total.

Resultados - expressão e cálculos

Expressão de IgA total

Os resultados são expressos como µg de IgA total em 1 mL de fluidos nasais, utilizando um programa *Softmaxpro*.

Expressão de IgA específica de anti-Gripe

Os resultados são expressos como título de unidade de ponto final, que são calculados como o inverso da última diluição que proporciona uma OD_{450nm} acima da exclusão.

Os resultados finais de uma amostra são expressos como se segue:

Normalização da resposta específica através do cálculo da razão entre a resposta específica e a concentração de IgA total: unidade de ponto final/µg de IgA total (método de cálculo mais geralmente utilizado na literatura).

2. Actividade de Inibição de hemaglutinação (HAI) de Abs séricos específicos de Gripe

Os soros (50 µL) são tratados com 200 µL de RDE (enzima de destruição de receptor), durante 16 horas, a 37 °C. A reacção é interrompida com 150 µL de citrato de Na a 2,5% e os soros são inactivados, a 56 °C, durante 30 min. É preparada uma diluição 1:10 através da adição de 100 µL de PBS. Depois, é preparada uma diluição em série de 2 vezes em placas de 96 poços (fundo em V),

através da diluição de 25 µL de soro (1:10) com 25 µL de PBS. São adicionados 25 µL dos antigénios de referência a cada poço, a uma concentração de 4 unidades de hemaglutinina por 25 µL. As diluições de抗igenio e anti-soro são misturadas utilizando um agitador de placas de microtitulação e incubadas, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. São, depois, adicionados 50 µL de glóbulos vermelhos de galinha (RBC) (0,5 %) e os RBC são deixados sedimentar, durante 1 hora, a t.a. O título de HAI corresponde ao inverso da última diluição sérica que inibe completamente a hemaglutinação induzida por vírus.

Exemplo 4 - Imunogenicidade e Reactogenicidade de Gripe ID

Foram efectuados ensaios clínicos em indivíduos humanos, de modo a avaliar a eficácia da vacina de influenza da invenção distribuída ID. A vacina (Fluarix™) utilizada neste estudo foi preparada de acordo com os Exemplos 1 e 2.

Cem voluntários masculinos e femininos saudáveis (18-60 anos de idade) foram recrutados e distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (50 indivíduos por grupo). A vacina foi administrada de acordo com duas vias de administração.

- Vacina de influenza fraccionada trivalente intramuscularmente administrada (Fluarix™):

1 dose → Dia 0.

A vacina foi proporcionada como uma seringa pré-cheia para injecção intramuscular na região deltóide do braço não predominante. De modo a garantir injecção intramuscular

conveniente das vacinas do estudo, foi utilizada uma agulha de, pelo menos, 23G (2,2 cm/lin.) de comprimento.

- Vacina de influenza fraccionada trivalente intradermicamente administrada (Fluarix™) :

1/5 dose → Dia 0

A vacina foi proporcionada como dose de ampola de 0,5 mL. 1/5 da dose completa (100 µL) foi injectada intradermicamente utilizando um dispositivo como divulgado no documento EP1092444. O dispositivo tem um elemento de contacto com a pele que eficazmente limita a profundidade de penetração da agulha dentro da derme. O comprimento de agulha eficaz foi, aproximadamente, 1,5 mm. Este dispositivo é aqui referido como o dispositivo de distribuição ID ou 'IDD'.

A duração do estudo foi, aproximadamente, 21 dias por indivíduos com apenas uma dose da vacina proporcionada intramuscularmente ou intradermicamente de acordo com o grupo. O sangue foi amostrado no dia 0 e 21.

A população de estudo foi como se segue:

Grupo 1	Grupo 2
Fluarix™ Intramuscular	Fluarix™ Intradérmica com IDD
0,5 mL de Fluarix™, lote Nº 18500A9	0,1 mL de Fluarix™, lote Nº 18526B7
N= 50	N= 50

O perfil demográfico dos 2 grupos de indivíduos que receberam vacina era comparável com respeito a idade média, género e distribuição racial.

Imunogenicidade

Para cada grupo de tratamento, foram calculados os seguintes parâmetros para imunogenicidade:

- Títulos médios geométricos (*geometric mean titres*) (com intervalos de confiança de 95%) de títulos de anticorpo HI, nos dias 0 e 21, calculados tomando o anti-log da média das transformações de título log (a títulos abaixo do valor de exclusão foi proporcionado o valor arbitrário de metade da exclusão para efeitos de cálculo).
- Taxas de seropositividade (S+) de títulos de anticorpo HI nos dias 0 e 21, definidas como a percentagem de indivíduos com título superior ou igual ao ensaio de exclusão.
- Factores de conversão no dia 21, definidos como o factor de aumento em GMT HI séricos no dia 21, em comparação com o dia 0.
- Taxas de seroconversão (SC) no dia 21, definidas como a percentagem de vacinados que têm, pelo menos, um aumento de 4 vezes em títulos HI séricos no dia 21, em comparação com o dia 0.

- Taxas de protecção no dia 21, definidas como a percentagem de vacinados com um título HI sérico $\geq 1:40$ após vacinação.

Ensaios laboratoriais e intervalos de tempo

Todas as amostras séricas foram mantidas a -20 °C e tomadas medidas adequadas, de modo a garantir que as amostras não descongelassem em qualquer momento. A cada visita, foi recolhido sangue para medição de resposta de anticorpo HI.

A resposta imunitária foi determinada pelo título de anticorpos inibindo hemaglutinação (HAI), medido pelo teste de inibição de hemaglutinação descrito pelo *WHO Collaborating Centre for Influenza, Centres for Diseases Control, Atlanta, EUA* (1991).

Amostras séricas congeladas foram recebidas em *Sächsisches soro GmbH (SSW)*, Dresden, Alemanha e a determinação de anticorpo foi conduzida em amostras após descongelação, com um micrométodo padronizado e comprehensivamente validado, utilizando 4 unidades inibindo hemaglutinação (4 HIU) dos antigénios apropriados e uma suspensão a 0,5% de eritrócitos de aves. Os antigénios A (H3N2 e H1N1) foram obtidos como antigénios de vírus intacto do fluido alantóico de ovos de galinha poedeira embrionados. O antigénio B foi submetido a clivagem com uma mistura de éter e Tween 80, de modo a aumentar a sensibilidade. Inibidores séricos não específicos foram removidos por tratamento térmico e enzima de destruição de receptor.

Os soros obtidos são avaliados para níveis de anticorpo HI. Começando com uma diluição inicial de 1:10, é preparada uma série de diluição (por um factor de 2) até uma diluição final de 1:20480. O ponto final de titulação é considerado como a etapa de diluição mais elevada que mostra inibição completa (100%) de hemaglutinação. Todos os ensaios são realizados em duplicado.

Resultados

Sendo o número de indivíduos o mesmo no grupo de imunogenicidade ATP e no grupo total, a análise de imunogenicidade foi realizada apenas numa base de intenção de tratar (ITT) (*i. e.*, grupo total).

Títulos HI e factores de conversão

Os títulos médios Geométricos (GMT) (com intervalos de confiança de 95%) de títulos de anticorpo HI nos dias 0 e 21, para os três grupos, são proporcionados na tabela abaixo:

*Taxas de seropositividade e Títulos Médios Geométricos
(GMT) (Grupo total)*

Anticorpo	Grupo	Timing	GMT	L.L.	U.L.	MIN	MÁX
A/NOVA CALEDÓNIA	Fluarix™ IM	PRÉ	66,3	45,8	96,0	<10,0	905,0
		PI (p21)	725,0	536,2	980,2	80,0	5120,0
	Fluarix™ ID com IDD	PRÉ	34,3	24,1	48,8	<10,0	640,0
		PI (D21)	313,3	223,1	440,1	28,0	2560,0
A/PANAMÁ	Fluarix™ IM	PRÉ	40,6	28,2	58,3	<10,0	640,0
		PI (D21)	365,1	262,8	507,1	40,0	5120,0
	Fluarix™ ID com IDD	PRÉ	23,9	17,1	33,6	<10,0	453,0
		PI (D21)	220,2	149,0	325,3	10,0	5120,0
B/ YAMANASHI	Fluarix™ IM	PRÉ	90,0	65,4	123,7	<10,0	640,0
		PI (D21)	983,6	741,0	1305,6	160,0	7241,0
	Fluarix™ utilizando dispositiv o de distribuiç ão ID	PRÉ	49,5	33,0	74,4	<10,0	1280,0
		PI (D21)	422,2	316,2	563,8	20,0	2560,0
PRÉ = pré-vacinação; PI (D21) = dia 21 pós-vacinação 95% de CI, L.L. e U.L. = intervalos de confiança de 95%, limite inferior e superior O número total de indivíduos foi de 50 em cada grupo							

As diferenças para as três estirpes (Nova Caledónia, A/Panamá e B/Yamanashi), entre os grupos no dia 0, eram não significativas ($p > 0,05$). No dia 21, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre o grupo ID e o grupo IM. Contudo, quando foram comparados os aumentos em títulos do dia 0 ao dia 21 (factor de conversão, ver a Tabela abaixo), não foi medida diferença significativa ($p > 0,05$) de um grupo para o outro, significando que os aumentos eram globalmente comparáveis.

Resultados HI não permitem discriminação entre o grupo de vacina intradérmica e o grupo de vacina intramuscular Fluarix™.

Factor de conversão (Grupo total).

Grupo	N	A/N-Caledónia [CI de 95%]	A/Panamá [CI de 95%]	B/Yamanashi [CI de 95%]
Fluarix IM.	50	10,6 [7,2 - 15,6]	9,3 [6,0 - 14,2]	10,9 [7,6 - 15,7]
Fluarix utilizando dispositivo de distribuição ID	50	9,1 [6,2 - 13,3]	9,2 [5,6 - 15,2]	8,5 [5,7 - 12,8]

O factor de conversão (factor de aumento em GMT HI séricos no dia 21, em comparação com dia 0) varia de 8,5 a 10,9, de acordo com a estirpe de vírus e a via de administração (ver a Tabela anterior). Este factor de conversão é superior ao factor de aumento de 2,5 em GMT requerido pelas Autoridades Europeias.

Uma análise de variância com o factor tratamento como critério de classificação foi utilizada para comparar os factores de conversão. Não foi medida diferença significativa entre os grupos de tratamento ($p>0,05$).

Taxa de seroprotecção

A taxa de seroprotecção mostrada na Tabela abaixo é definida como a percentagem de vacinados com um título HI sérico ≥ 40 após vacinação.

Distribuição de títulos de anticorpo individuais e taxas de protecção (Grupo total)

Anticorpo	Grupo	Timing	N	<40		>=40	
				n	%	n	%
A/NOVA-CALEDÓNIA	Fluarix™ IM	PRÉ	50	15	30,0	35	70,0
		PI(D21)	50	0	0,0	50	100,0
	Fluarix™ ID com IDD	PRÉ	50	26	52,0	24	48,0
		PI(D21)	50	1	2,0	49	98,0
A/PANAMÁ	Fluarix™ IM	PRÉ	50	21	42,0	29	58,0
		PI(D21)	50	0	0,0	50	100,0
	Fluarix™ ID com IDD	PRÉ	50	29	58,0	21	42,0
		PI(D21)	50	2	4,0	48	96,0
B/YAMANASHI	Fluarix™ IM	PRÉ	50	8	16,0	42	84,0
		PI(D21)	50	0	0,0	50	100,0

(continuação)

Anticorpo	Grupo	Timing	N	<40		>=40	
				n	%	n	%
	Fluarix™ ID com IDD	PRÉ	50	20	40,0	30	60,0
		PI (D21)	50	1	2,0	49	98,0

PRÉ = pré-vacinação, PI (D21) = dia 21 pós-vacinação
 N = número de indivíduos testados.
 n = número de indivíduos com títulos HI < ou >= 40
 % = n/N x 100%
 < 40: Títulos inferiores a 40 HIU
 > = 40: Títulos superiores ou iguais a 40 HIU

No dia 21, as taxas de seroprotecção nos grupos variaram de 96% a 100% para as diferentes estirpes de vírus. Em termos de protecção, isto significa que mais de 95% dos indivíduos (seja qual for a via de administração) tinham um título HI sérico ≥ 40 após vacinação e foram considerados como estando protegidos contra as três estirpes. Esta taxa é superior à taxa de seroprotecção de 70% requerida na população de 18-60 anos de idade pelas Autoridades Europeias.

Taxa de seroconversão.

O factor de seroconversão proporcionado na Tabela abaixo é definido como a percentagem de vacinados que têm, pelo menos, um aumento de 4 vezes em títulos HI séricos após vacinação.

Respostas vacinais e seroconversão (Grupo total)

Anticorpo	Grupo	Estatuto de Prevacc.	N	Respondedores			
				n	%	95% de CI	
						LL	UL
A/NOVA-CALEDÓNIA	Fluarix™ IM	Total	50	39	78	64	88,5
	Fluarix™ ID com IDD	Total	50	37	74	59,7	85,4
A/PANAMÁ	Fluarix™ IM	Total	50	36	72	57,5	83,8
	Fluarix™ ID com IDD	Total	50	33	66	51,2	78,8
B/YAMANASHI	Fluarix™ IM	Total	50	40	80	66,3	90
	Fluarix™ ID com IDD	Total	50	35	70	55,4	82,1

95% de CI, L.L. e U.L. = intervalos de confiança de 95%, limite inferior e superior

N = número de indivíduo testado

n = número de indivíduo respondendo a vacinação.

% = n/N x 100%

Para ser considerada eficaz e de acordo com os requisitos da Autoridade Europeia, uma vacina deve induzir uma taxa de seroconversão superior a 40% na população de 18-60 anos de idade. Neste estudo, a taxa de seroconversão foi superior a 65% para os grupos.

Reactogenicidade

A administração intradérmica da vacina foi segura (não foram referidos eventos adversos sérios) e clinicamente bem tolerada, com muito poucas referências de sintomas gerais relacionados com a vacinação.

Conclusões

- Fluarix™ induziu boas respostas imunitárias para cada estirpe, com uma elevada taxa de seroconversão após uma dose, seja qual for a via de administração (ID ou IM).
- Não existiu diferença significativa entre a resposta imunitária deduzida por 1/5 da dose de Fluarix™ proporcionada intradermicamente e pela dose completa administrada pela via IM.
- Ambas as vacinações cumpriram o requisito das Autoridades Europeias para vacinas inactivadas de influenza na população de 18-60 anos de idade, *i. e.,*
 - Induzem uma taxa de seroconversão superior a 40%.
 - Aumentam o título médio geométrico em mais de 2,5.
 - Deduzem uma taxa de seroprotecção de 70%.

Exemplo 5: - Imunogenicidade e Reactogenicidade de Gripe ID: Estudo 2 (Exemplo ilustrativo)

Preparação de preparação antigénica de vírus influenza

Vacina fraccionada monovalente foi preparada de acordo com o seguinte processo.

Preparação de inóculo de vírus

No dia de inoculação de ovos embrionados é preparado um inóculo fresco, através da mistura do lote de sementeira de trabalho com uma solução salina tamponada com fosfatos, contendo sulfato de gentamicina a 0,5 mg/mL e hidrocortisona a 25 µg/mL. (dependente de estirpe de vírus). O inóculo de vírus é mantido a 2-8 °C.

Inoculação de ovos embrionados

São utilizados ovos embrionados com nove a onze dias de idade para replicação de vírus. As cascas são descontaminadas. Os ovos são inoculados com 0,2 mL do inóculo de vírus. Os ovos inoculados são incubados, à temperatura apropriada (dependente de estirpe de vírus), durante 48 a 96 horas. No final do período de incubação, os embriões são mortos através de arrefecimento e os ovos são armazenados, durante 12-60 horas, a 2-8 °C.

Recolha

O fluido alantóico dos ovos embrionados arrefecidos é recolhido. Habitualmente, são recolhidos 8 a 10 mL de fluido alantóico em bruto por ovo.

Concentração e purificação de vírus intacto de fluido alantóico

1 Clarificação

O fluido alantóico recolhido é clarificado por centrifugação de velocidade moderada (gama: 4000 - 14000 g).

2 Etapa de adsorção

De modo a obter-se um gel de CaHPO₄ no agregado de vírus clarificado, são adicionadas soluções de Na₂HPO₄ a 0,5 mol/L e CaCl₂ a 0,5 mol/L para se atingir uma concentração final de CaHPO₄ de 1,5 g a 3,5 g de CaHPO₄/litro, dependendo da estirpe de vírus.

Após sedimentação durante, pelo menos, 8 horas, o sobrenadante é removido e o sedimento contendo o vírus influenza é ressolvabilizado por adição de uma solução de EDTA-Na₂ a 0,26 mol/L, dependente da quantidade de CaHPO₄ utilizada.

3 Filtração

O sedimento ressuspenso é filtrado numa membrana filtrante de 6 µm.

4 Centrifugação de gradiente de sacarose

O vírus influenza é concentrado por centrifugação isopícnica num gradiente linear de sacarose (0,55% (p/v)), contendo Tiomersal a 100 µg/mL. O caudal é 8 - 15 litros/hora.

No final da centrifugação, o conteúdo do rotor é recuperado em quatro fracções diferentes (a sacarose é medida num refractómetro) :

- fracção 1 55-52% de sacarose
- fracção 2 aproximadamente 52-38% de sacarose
- fracção 3 38-20% de sacarose*
- fracção 4 20-0% de sacarose

* dependente de estirpe de vírus: a fracção 3 pode ser reduzida para 15% de sacarose.

Para preparação vacinal adicional, são utilizadas apenas as fracções 2 e 3.

A fracção 3 é lavada por diafiltração com tampão de fosfatos, com o fim de reduzir o teor de sacarose para, aproximadamente, abaixo de 6%. O vírus influenza presente nesta

fracção diluída é sedimentado, de modo a remover contaminantes solúveis.

O sedimento é ressuspenso e exaustivamente misturado, de modo a obter-se uma suspensão homogénea. A fracção 2 e o sedimento ressuspenso da fracção 3 são agregados e é adicionado tampão de fosfatos, de modo a obter-se um volume de, aproximadamente, 40 litros, num volume apropriado para 120000 ovos/lote. Este produto é o concentrado de vírus intacto monovalente.

5 Centrifugação de gradiente de sacarose com desoxicolato de sódio

O concentrado de vírus influenza intacto monovalente é aplicado a uma ultracentrífuga *ENI-Mark II*. O rotor K3 contém um gradiente linear de sacarose (0,55% (p/v)), onde é adicionalmente revestido um gradiente de desoxicolato de sódio. Tween 80 está presente durante o fraccionamento até 0,1% (p/v) e é adicionado succinato de Tocoferol a vírus de estirpe B até 0,5 mM. A concentração máxima de desoxicolato de sódio é 0,7-1,5% (p/v) e é dependente de estirpe. O caudal é 8 - 15 litros/hora.

No final da centrifugação, o conteúdo do rotor é recuperado em três fracções diferentes (a sacarose é medida num refractómetro). A fracção 2 é utilizada para processamento adicional. O teor de sacarose para limites de fracção (47-18%) varia de acordo com as estirpes e é fixado após avaliação:

6 Filtração estéril

A fracção de vírus fraccionado é filtrada em membranas filtrantes, terminando com uma membrana de 0,2 µm. Tampão de fosfatos contendo Tween 80 a 0,025% (p/v) e (para vírus de estirpe B) succinato de Tocoferol a 0,5 mM é utilizado para diluição. O volume final da fracção filtrada é 2 a 5 vezes o volume de fracção original.

7 Inactivação

O material monovalente filtrado é incubado a 22 ± 2 °C, durante, no máximo 84 horas (dependente das estirpes de vírus, esta incubação pode ser encurtada). Tampão de fosfatos contendo 0,025% (p/v). Tween 80 é, depois, adicionado, com o fim de reduzir o teor de proteína total para um máx. de 250 µg/mL. Para vírus de estirpe B, uma solução salina tamponada com fosfatos, contendo Tween 80 a 0,025% (p/v) e succinato de Tocoferol a 0,25 mM, é aplicada para diluição, de modo a reduzir o teor de proteína total para 250 µg/mL. É adicionado formaldeído para uma concentração final de 50 µg/mL e a inactivação ocorre a $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ °C durante, pelo menos, 72 horas.

8 Ultrafiltração

O material de vírus fraccionado inactivado é concentrado, pelo menos, 2 vezes numa unidade de ultrafiltração, equipada com membranas de acetato de celulose com MWCO de 20 kDa. O Material é subsequentemente lavado com tampão de fosfatos contendo Tween 80 a 0,025% (p/v) e seguindo com solução salina tamponada com

fosfatos contendo Tween a 0,01% (p/v). Para vírus de estirpe B, uma solução salina tamponada com fosfatos, contendo Tween 80 a 0,01% (p/v) e succinato de Tocoferol a 0,1 mM, é utilizada para diluição.

9 Filtração estéril final

O material após ultrafiltração é filtrado em membranas filtrantes, terminando com uma membrana de 0,2 µm. As membranas filtrantes são enxaguadas e o material, se necessário, é diluído, de modo a que a concentração de proteína não exceda 1000 µg/mL mas a concentração de hemaglutinina exceda 180 µg/mL, com solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 80 a 0,01% (p/v) e (para vírus de estirpe B) succinato de Tocoferol a 0,1 mM.

10 Armazenamento

O volume final monovalente é armazenado a 2 - 8 °C durante um máximo de 18 meses.

Exemplo 6 - Preparação de vacina de influenza

Volumes finais monovalentes de três estirpes, A/Nova Caledónia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panamá/2007/99 (H3N2) Resvir-17 e B/Joanesburgo/5/99 foram produzidos de acordo com o método descrito no Exemplo 5.

Agregação

A quantidade apropriada de volumes finais monovalentes foi agregada para uma concentração de HA final de 60 µg/mL para A/Nova Caledónia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panamá/2007/99 (H3N2) Resvir-17, respectivamente e de 68 µg/mL para B/Joanesburgo/5/99. Tween 80, Triton X-100 e succinato de Tocoferol foram ajustados para 1000 µg/mL, 110 µg/mL e 160 µg/mL, respectivamente. O volume final foi ajustado para 3 L com solução salina tamponada com fosfatos. O agregado trivalente foi filtrado, terminando com membrana de acetato de celulose de 0,8 µm, de modo a obter o volume final trivalente. O volume final trivalente foi introduzido em seringas, pelo menos, 0,165 mL em cada.

Administração de vacina

A vacina foi proporcionada em seringas pré-cheias e foi administrada intradermicamente na região deltóide. A agulha intradérmica (ID) foi como descrito no documento EP 1092444, tendo um limitador de penetração na pele, de modo a garantir injecção intradérmica conveniente. Visto que a formação de um vergão (pápula) no local de injecção demonstra a boa qualidade da administração ID, o investigador com o indivíduo mediu o tamanho exacto do vergão, 30 minutos após vacinação.

Uma dose (100 µL) continha os seguintes componentes:

HEMAGLUTININA DE TRÊS ESTIRPES DE INFLUENZA		
	A/NOVA CALEDÓNIA/20/99	: 6,0 µg
	A/PANAMÁ/2007/99	: 6,0 µg
	B/JOANESBURGO 5/99	: 6,0 µg
CONSERVANTE TIOMERSAL		: 0,4 µg - 0,8 µg

A vacina anterior foi comparada com uma vacina de influenza fraccionada trivalente padrão: Fluarix™. A vacina Fluarix foi proporcionada em seringas pré-cheias e foi administrada intramuscularmente no músculo deltóide. Foi utilizada uma agulha de, pelo menos, 2,5 cm / 1 polegada em comprimento (calibre 23), de modo a garantir injecção intramuscular conveniente.

Uma dose (0,5 mL) continha os seguintes componentes:

HEMAGLUTININA DE TRÊS ESTIRPES DE INFLUENZA		
	A/NOVA CALEDÓNIA/20/99	: 15,0 µg
	A/PANAMÁ/2007/99	: 15,0 µg
	B/JOANESBURGO 5/99	: 15,0 µg
CONSERVANTE TIOMERSAL		: 50,0 µg

Resultados

A idade média do grupo total no momento da administração da vacina foi $70,4 \pm 6,2$ anos Desvio-Padrão (S.D.), a razão masculino/feminino foi de 1,7:1.

(c

Resultados de imunogenicidade: A análise de variáveis de imunogenicidade derivadas foi como se segue:							
Variável		Flu-red ID (N = 65)			Fluarix™ IM (N = 65)		
		GMT	LL	UL	GMT	LL	UL
A/NOVA CALEDÓNIA	PRÉ	99,5	76,9	128,7	90,0	70,1	115,7
	PÓS	165,1	129,2	211,0	174,3	133,3	227,9
A/PANAMÁ	PRÉ	75,5	54,7	104,2	69,2	51,9	92,4
	PÓS	128,6	99,1	166,8	164,3	126,0	214,1
B/JOANESBURGO	PRÉ	236,0	187,7	296,8	222,6	176,9	280,2
	PÓS	341,2	276,0	421,7	402,4	312,1	518,9
Taxa de seroconversão		%	LL	UL	%	LL	UL
A/NOVA CALEDÓNIA		15,4	7,6	26,5	18,5	9,9	30,0
A/PANAMÁ		20,0	11,1	31,8	29,2	18,6	41,8
B/JOANESBURGO		9,2	3,5	19,0	16,9	8,8	28,3
Factor de conversão		GMR	LL	UL	GMR	LL	UL
A/NOVA CALEDÓNIA		1,7	1,4	2,0	1,9	1,6	2,3
A/PANAMÁ		1,7	1,4	2,1	2,4	1,9	3,0
B/JOANESBURGO		1,4	1,2	1,7	1,8	1,5	2,1
Taxa de seroprotecção		%	LL	UL	%	LL	UL
A/NOVA CALEDÓNIA	PRÉ	87,7	77,2	94,5	90,8	81,0	96,5
	PÓS	92,3	83,0	97,5	96,9	89,3	99,6
A/PANAMÁ	PRÉ	75,4	63,1	85,2	81,5	70,0	90,1
	PÓS	90,8	81,0	96,5	93,8	85,0	98,3

(continuação)

Resultados de imunogenicidade: A análise de variáveis de imunogenicidade derivadas foi como se segue:								
Variável		Flu-red ID (N = 65)			Fluarix™ IM (N = 65)			
		B/JOANESBURGO	PRÉ	98,5	91,7	100,0	96,9	89,3
		PÓS	100,0	94,5	100,0	98,5	91,7	100,0
N: número de indivíduos com resultados disponíveis; %: percentagem de indivíduos dentro do parâmetro proporcionado, LL/UL: limite inferior e superior de 95% de CI: Pré: no momento da administração da vacina: Pós: 21 dias após a dose vacinal								

Dor no local de injeção, referida por 10/65 (15,4%) de vacinados, foi o sintoma mais comum depois de administração IM de Fluarix™. No grupo ID, a dor foi referida por 3/65 (4,6%) de vacinados. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,038$; teste exacto de Fisher). A frequência de dor é, por conseguinte, reduzida quando se utiliza administração ID.

Conclusões

A administração ID de uma vacina da gripe proporciona seroprotecção equivalente (100%) numa população idosa.

Verificou-se uma resposta comparável a vacinação em termos de títulos médios geométricos, taxas de seroprotecção, taxas de

seroconversão e factores de conversão em indivíduos vacinados IM e ID, onde o grupo ID recebeu 2,5 vezes menos antigénio.

Não existiu diferença discernível na incidência global de sintomas sistémicos solicitados/não solicitados relacionados com vacina nos dois grupos de tratamento.

Exemplo 7 - Distribuição intradérmica utilizando agulha padrão (Exemplo ilustrativo)

A imunogenicidade da vacina de influenza fraccionada foi avaliada por distribuição ID em porcos utilizando uma agulha padrão.

Os porcos mostram importantes semelhanças fisiológicas com humanos e a pele de porco, em particular, é bastante semelhante à pele humana em termos de aparência, anatomia e fisiologia. Por conseguinte, estudos onde propriedades da pele são importantes podem ser avaliados do modo mais relevante em porcos. O porco também tem a vantagem de que é um hospedeiro natural para infecção de influenza (apenas estirpe A) e, deste modo, a testagem de candidatos vacinais em porcos é relevante.

Num primeiro estudo de imunogenicidade conduzido em porcos de 4 semanas de idade, 3 grupos de 6 porcos cada foram submetidos a imunização primária, por administração intranasal de influenza intacto, inactivado, trivalente (50 µg de HA cada, adjuvanteada com Laureth 9 a 0,5%) num volume total de 200 µL - 100 µL, administrados em cada narina utilizando um dispositivo intranasal Pfeiffer (descrito, por exemplo, nos documentos WO 91/13281, EP 311863 B e EP 516636 B,

comercialmente disponíveis a partir de *Pfeiffer GmbH*). Uma segunda dose de imunização primária foi administrada no dia 11.

No dia 39, os animais foram vacinados quer pela via ID (Fluarix™ ou controlo de PBS) ou IM (apenas Fluarix™). Animais recebendo vacinação IM foram imunizados com Fluarix™ trivalente (15 µg de HA cada, de estirpes A/Nova Caledónia H1N1, A/Panamá H3N2 e B/Joanesburgo) em 0,5 mL administrados na perna dianteira. Animais recebendo vacinação ID foram imunizados com Fluarix™ trivalente (3 µg de HA cada) ou PBS em 0,1 mL administrados utilizando uma agulha padrão.

As amostras sanguíneas foram obtidas no dia 53 e testadas para actividade de anti-influenza utilizando ensaios ELISA.

Os resultados deste primeiro estudo de imunogenicidade são apresentados na Fig 1, que mostra os resultados obtidos deste estudo utilizando a leitura de ELISA específica de estirpe.

Legenda para a Figura 1:

Grupo 1: 2 Imunizações primárias IN (Trivalente, 50 µg); vacina trivalente IM, 15 µg de HA

Grupo 2: 2 Imunizações primárias IN (Trivalente, 50 µg); vacina trivalente ID, 3 µg de HA

Grupo 3: 2 Imunizações primárias IN (Trivalente, 50 µg); PBS ID

Os resultados confirmam a imunogenicidade da vacina de influenza trivalente administrada a porcos submetidos a imunização primária quer pela via IM ou ID.

Exemplo 8 - Distribuição intradérmica de vacina de influenza adjuvanteada (Exemplo ilustrativo)

Protocolo

Porquinhos-da-índia foram submetidos a imunização primária no Dia 0 com 5 µg de vírus da Gripe inactivado intacto trivalente, intranasalmente.

Vacinação - Dia 28 - Vacina contendo 0,1 µg de HA cada por estirpe fraccionada trivalente

A vacina da Gripe preparada como descrito nos Exemplos 5 e 6, com a excepção de que a agregação (Exemplo 6) resultou numa concentração final para cada antigénio de 1,0 µg/mL, de modo a proporcionar uma dose de 0,1 µg em 100 µL, em comparação com 60 µg/mL no Exemplo 6. A formulação trivalente final foi administrada intradermicamente utilizando seringas de tuberculina, quer adjuvanteadas ou não adjuvanteadas, em 100 µL.

Sangramento - Dia 42.

O efeito de adjuvanteação foi avaliado através da medição de respostas de anticorpo pelo ensaio HI (dia 0, 28, 42).

Todas as experiências ID foram efectuadas utilizando uma agulha padrão.

Resultados

G1-G5 refere-se a 5 grupos de porquinhos-da-índia, 5 por grupo.

G1	0,1 µg de tiomersal trivalente fraccionado reduzido
G2	0,1 µg de <i>thio red</i> trivalente fraccionado + 50 µg de 3D-MPL
G3	0,1 µg de <i>thio red</i> trivalente fraccionado + 10 µg de 3D-MPL
G4	0,1 µg de <i>thio red</i> trivalente fraccionado + 50 µg de 3D-MPLin + 50 µg de QS21
G5	0,1 µg de <i>thio red</i> trivalente fraccionado + 10 µg de 3D-MPLin + 10 µg de QS21

Nota 3D-MPLin + QS21 refere-se a uma formulação de adjuvante que compreende uma vesícula unilamelar compreendendo colesterol, tendo uma bicamada lipídica compreendendo dioleoil fosfatidilcolina, em que o QS21 e o 3D-MPL estão associados a, ou embutidos dentro, da bicamada lipídica. Tais formulações de adjuvante são descritas no documento EP 0822831 B.

Títulos HI anti-A/Nova Caledónia/20/99

NC	Pré-imune	Pré-reforço	Pós-reforço
G1	5	10	92
G2	5	10	70
G3	5	11	121

(continuação)

NC	Pré-imune	Pré-reforço	Pós-reforço
G4	7	9	368
G5	5	10	243

Títulos HI anti-A/Panamá/2007/99

P	Pré-imune	Pré-reforço	Pós-reforço
G1	5	485	7760
G2	5	279	7760
G3	5	485	8914
G4	7	485	47051
G5	5	320	17829

Títulos HI anti-B/Joanesburgo/5/99

J	Pré-imune	Pré-reforço	Pós-reforço
G1	5	23	184
G2	5	11	121
G3	5	11	70
G4	6	15	557
G5	5	13	320

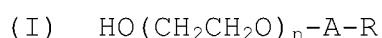
Os dados apresentados neste exemplo confirmam e ampliam os resultados obtidos no exemplo anterior, conduzido em porcos. A administração ID de vacina da Gripe trivalente induziu uma forte

resposta imunitária em animais submetidos a imunização primária (porquinhos-da-índia adicionalmente a porcos). Adicionalmente, é exemplificado o potencial para os adjuvantes adicionalmente reforçarem esta resposta imunitária. Mostrou-se que duas doses diferentes de 3D-MPLin + QS21 reforçam significativamente os títulos de anticorpo induzidos por vacinação com antígenio da Gripe trivalente fraccionado não adjuvanteado. Deste modo, uma vacina da Gripe pode ser adjuvanteada com êxito e o produto resultante pode induzir respostas imunitárias melhoradas em indivíduos vacinados.

Lisboa, 31 de Maio de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma preparação trivalente antigénica de influenza fraccionada, proporcionada num dispositivo de distribuição intradérmica de agulha curta, adaptado para limitar a administração a uma localização entre 1,0 e 2,0 mm sob a superfície da pele, na preparação de uma vacina de influenza monodose que deve ser distribuída intradermicamente.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o antigénio de influenza é derivado de ovo.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a vacina é capaz de induzir uma resposta imunitária protectora para todas as três estirpes de influenza numa população humana adulta (18-60 anos de idade) ou idosa (acima de 60 anos de idade).
4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a vacina compreende, pelo menos, um surfactante não iónico, seleccionado do grupo consistindo de octilfenoxipolioxietanóis ou nonilfenoxipolioxietanóis (por exemplo, a série Triton™ comercialmente disponível), ésteres de polioxietileno sorbitano (série Tween™) e éteres ou ésteres de polioxietileno, de fórmula geral (I):



na qual n é 1-50, A é uma ligação ou -C(O)-, R é alquiloC₁₋₅₀ ou fenilalquiloC₁₋₅₀; e combinações de dois ou mais destes.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que a vacina compreende uma combinação de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween™ 80) e t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton™ X-100).
6. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a vacina compreende adicionalmente um ácido biliar ou ácido cólico, ou derivado deste, tal como desoxicolato de sódio.
7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a vacina é proporcionada num volume compreendido entre cerca de 0,1 e cerca de 0,2 mL por dose.
8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a vacina é proporcionada com uma dose de antigénio de 1-7,5 µg de hemaglutinina por estirpe de influenza presente.
9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a vacina adicionalmente compreende um adjuvante, tal como um adjuvante compreendendo uma combinação de colesterol, uma saponina e um derivado de LPS.

10. Kit farmacêutico compreendendo:

- (i) um dispositivo de distribuição intradérmica de agulha curta, adaptado para limitar a administração a uma localização entre 1,0 mm e 2,0 mm sob a superfície da pele; e
- (ii) uma vacina de influenza fraccionada trivalente.

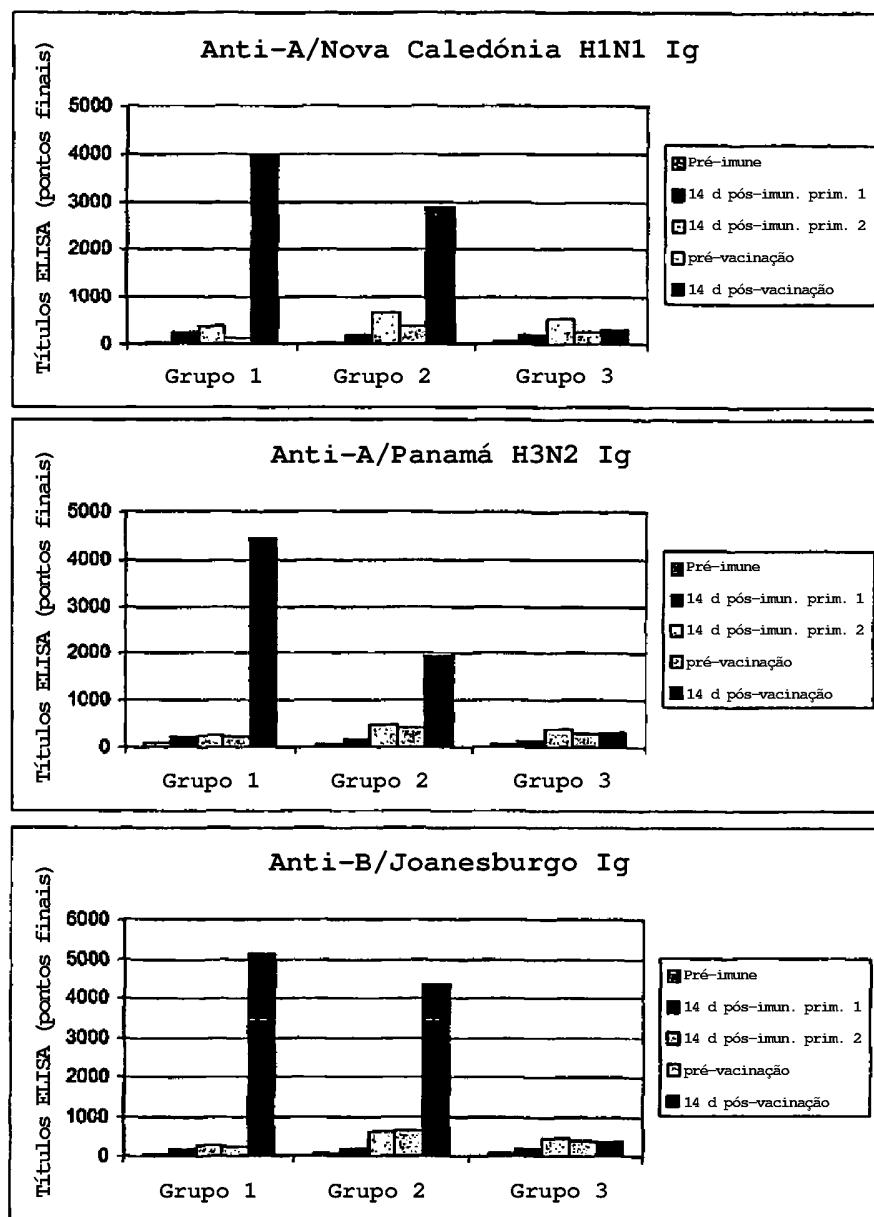
11. Kit farmacêutico de acordo com a reivindicação 10, em que o volume de vacina está entre cerca de 0,05 e 0,2 mL.

12. Kit farmacêutico de acordo quer com a reivindicação 10 ou 11, em que o dispositivo de distribuição intradérmica é proporcionado já cheio com a vacina.

13. Preparação antigénica de influenza fraccionada trivalente, proporcionada num dispositivo de distribuição intradérmica de agulha curta, adaptado para limitar a administração a uma localização entre 1,0 e 2,0 mm sob a superfície da pele, para utilização como uma vacina de influenza intradérmica monodose.

Lisboa, 31 de Maio de 2011

Figura 1: Títulos de Imunoglobulina Anti-Influenza em Porcos Submetidos a Imunização Primária depois de Vacinação IM ou ID com Fluarix™



RESUMO

"FORMULAÇÕES VACINAIS DE INFLUENZA PARA DISTRIBUIÇÃO INTRADÉRMICA"

A invenção refere-se à utilização de uma preparação trivalente antigénica de influenza não viva, particularmente uma preparação de influenza fraccionada, na preparação de uma vacina de influenza para distribuição intradérmica em monodose. Em particular, a invenção refere-se à utilização de preparações de influenza fraccionadas, em que a vacina compreende, pelo menos, um surfactante não iónico, seleccionado do grupo consistindo nos octilfenoxipolioxietanóis ou nonilfenoxipolioxietanóis (por exemplo, a série Triton™ comercialmente disponível), ésteres de polioxietileno sorbitano (série Tween™) e éteres ou ésteres de polioxietileno, de fórmula geral (I): HO(CH₂CH₂O)_n-A-R, na qual n é 1-50, A é uma ligação ou -C(O)-, R é alquiloC₁₋₅₀ ou fenilalquiloC₁₋₅₀; e combinações de dois ou mais destes.