INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 914153 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/295 (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1997.07.02**

(30) Prioridade(s): **1996.07.02 US 0672530**

(43) Data de publicação do pedido: **1999.05.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.11**
001/2007

(73) Titular(es):
AVENTIS PASTEUR LIMITED
1755 STEELES AVENUE WEST TORONTO, ONTARIO M2R 3T4 **CA**

(72) Inventor(es):
JOHN THIPPHAWONG **CA**
LUIS BARRETO **CA**
RAAFAT, E., F. FAHIM **CA**
LARRY, U., L. TAN **CA**
GAIL, E., D. JACKSON **CA**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **VACINAS DTP-POLIO MULTIVALENTES**

(57) Resumo:

RESUMO

"Vacinas DTP-polio multivalentes"

Descreve-se uma composição de vacina multicomponentes incluindo componentes acelulares de vacina de *pertussis*, toxóide de difteria, toxóide de tétano e poliovírus inactivado. A composição pode também conter um conjugado de um polissacárido de cápside de *Haemophilus influenzae* tipo b e toxóide de tétano ou toxóide de difteria, que pode ser reconstituído a partir de um estado liofilizado pelas outras componentes da vacina. A administração da vacina multicomponentes não resulta em qualquer diminuição da imunogenicidade de qualquer componente como resultado de interferência de outras componentes da vacina.

DESCRIÇÃO

"Vacinas DTP-polio multivalentes"

O presente invento refere-se a vacinas multivalentes, nomeadamente para administração pediátrica.

A tosse convulsa ou *pertussis* é uma infecção do tracto respiratório superior grave e altamente contagiosa causada por *Bordetella pertussis*. A organização mundial de saúde estima que ocorrem 60 milhões de casos de *pertussis* por ano e 0,5 a 1 milhão de mortes associadas (ref. 1. Ao longo desta especificação fazem-se várias referências entre parênteses para descrever mais completamente o estado da arte pertinente para este invento. A informação bibliográfica completa para cada citação encontra-se no final da especificação, imediatamente após as reivindicações. As revelações destas referências são aqui incorporadas por referência na presente revelação). Em populações não vacinadas, tem sido observada uma taxa de incidência de *pertussis* tão elevada como 80% em crianças com menos de 5 anos de idade (ref. 2). Apesar da *pertussis* ser geralmente considerada uma doença da infância, há cada vez mais evidências de doença clínica e assintomática em adolescentes e adultos (ref. 3, 4 e 5).

A introdução de vacinas de células completas compostas por organismos de *B. pertussis* inactivados quimicamente e pelo calor nos anos 1940, foi responsável por uma redução drástica da incidência de tosse convulsa causada por *B. pertussis*. As taxas de eficácia para vacinas de células completas têm sido estimadas como sendo até 95% dependendo da definição do caso (ref. 6). Apesar da infecção com *B. pertussis* conferir imunidade para toda a vida, há cada vez mais evidências para a atenuação da protecção após imunização com as vacinas de células completas (ref. 3). Vários relatos citando uma relação entre vacinação de células completas de *pertussis*, reactogenicidade e efeitos secundários graves levaram a uma diminuição na aceitação da vacina e consequente epidemiologia renovada (ref. 7). Mais recentemente têm sido desenvolvidas vacinas de *pertussis* com componentes definidas.

Antigénios para vacinas de *pertussis* definidas

Têm sido desenvolvidas várias vacinas de *pertussis* acelulares e incluíram os antigénios de *Bordetella pertussis*, toxina de *pertussis* (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), a proteína de membrana externa de 69 kDa (pertactina) e aglutinogénios fimbriais (consultar tabela 1 infra. As tabelas são apresentadas no final da especificação).

Toxina de *pertussis*

A toxina de *pertussis* é uma exotoxina que é um membro da família A/B de toxinas bacterianas com actividade ADP-ribosiltransferase (ref. 8). A parte A destas toxinas apresenta a actividade ADP-ribosiltransferase e a parte B medeia a ligação da toxina aos receptores da célula hospedeira e a translocação de A para o seu local de acção. PT também facilita a adesão de *B. pertussis* a células epiteliais ciliadas (ref. 9) e também desempenha um papel na invasão de macrófagos por *B. pertussis* (ref. 10).

Todas as vacinas de *pertussis* acelulares têm incluído PT, que tem sido proposto como um importante factor de virulência e antigénio protector (ref. 11, 12). A infecção natural com *B. pertussis* gera respostas a PT tanto humorais como mediadas pela célula (ref. 13 a 17). Bebés com anticorpos anti-PT derivados através da placenta (ref. 16, 18) e colostro humano contendo anticorpos anti-PT, foram eficazes na protecção passiva de ratinhos contra infecção por aerossol (ref. 19). Foi demonstrada uma resposta imune mediada pela célula (CMI) a subunidades PT após imunização com uma vacina acelular (ref. 20) e foi gerada uma resposta CMI a PT após vacinação com células completas (ref. 13). PT inactivada quimicamente em vacinas de células completas ou de componentes é protectora em modelos animais e em humanos (ref. 21). Além disso, anticorpos monoclonais específicos para a subunidade S1 protegem contra infecção por *B. pertussis* (ref. 22 e 23).

Os principais efeitos patofisiológicos de PT são devidos à sua actividade ADP-ribosiltransferase. A PT catalisa a transferência de ADP-ribose de NAD para a proteína de ligação de nucleótido Gi guanina, interrompendo assim o sistema de

regulação da adenilato-ciclase celular (ref. 24). A PT também evita a migração de macrófagos e linfócitos para locais de inflamação e interfere com a fagocitose mediada por neutrófilos e a morte de bactérias (ref. 25). Têm sido utilizados vários ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar a actividade enzimática de S1 e/ou PT, incluindo ADP-ribosilação de transducina de bovino (ref. 26), ensaio de agregação de células de ovário de *hamster* chinês (CHO) (ref. 27), sensibilização de histamina (ref. 28), leucocitose e NAD glico-hidrolase. Quando expostas a PT as células CHO desenvolvem uma morfologia agregada característica. Este fenómeno depende da ligação de PT e subsequente translocação e actividade ADP-ribosiltransferase de S1 e assim o ensaio de agregação de células CHO é largamente utilizado para ensaiar a integridade e toxicidade de holotoxinas PT.

Hemaglutinina filamentosa

A hemaglutinina filamentosa é um polipéptido grande (220 kDa) e não tóxico que media a ligação de *B. pertussis* a células ciliadas do tracto respiratório superior durante colonização bacteriana (ref. 9, 29). A infecção natural induz anticorpos anti-FHA e imunidade mediada pela célula (ref. 13, 15, 17, 30 e 31). Encontram-se anticorpos anti-FHA no colostro humano e são também transmitidos através da placenta (ref. 17, 18 e 19). A vacinação com células completas ou vacinas de *pertussis* acelulares gera anticorpos anti-FHA e vacinas acelulares contendo FHA também induzem uma resposta CMI a FHA (ref. 20, 32). FHA é um antigénio protector num modelo de provocação respiratória de ratinho após imunização activa ou passiva (ref. 33, 34). Contudo, a FHA sozinha não protege no ensaio de potência de provocação intracerebral de ratinho (ref. 28).

Proteína de membrana externa de 69 kDa (pertactina)

A proteína de 69 kDa é uma proteína de membrana externa que foi originalmente identificada em *B. bronchiseptica* (ref. 35). A proteína também é conhecida como pertactina e P.69. Demonstrou-se que é um antigénio protector contra *B. bronchiseptica* e foi subsequentemente identificada tanto em *B. pertussis* como em *B. parapertussis*. A proteína de 69 kDa

liga-se directamente a células eucarióticas (ref. 36) e a infecção natural com *B. pertussis* induz uma resposta humoral anti-P.69 (ref. 14) e P.69 também induz uma resposta imune mediada pela célula (ref. 17, 37, 38). A vacinação com células completas ou vacinas acelulares induz anticorpos anti-P.69 (ref. 32, 39) e as vacinas acelulares induzem P.69 CMI (ref. 39). A pertactina protege ratinhos contra provocação por aerossol com *B. pertussis* (ref. 40) e em combinação com FHA, protege no ensaio de provocação intracerebral contra *B. pertussis* (ref. 41). A transferência passiva de anticorpos anti-P.69 policlonais ou monoclonais também protege ratinhos contra provocação por aerossol (ref. 42).

Aglutinogénios

Definem-se os serótipos de *B. pertussis* pelas suas fímbrias de aglutinação. A OMS recomenda que as vacinas de células completas incluam aglutinogénios (Agg) dos tipos 1, 2 e 3 dado que estes não proporcionam protecção cruzada (ref. 43). Agg 1 é não fimbrial e encontra-se em todas as estirpes de *B. pertussis*, enquanto que os Agg dos serótipos 2 e 3 são fimbriais. A infecção natural ou imunização com células completas ou vacinas acelulares induzem anticorpos anti-Agg (ref. 15, 32). Pode gerar-se uma resposta imune mediada pela célula específica em ratinhos pelos Agg 2 e Agg 3 após infecção por aerossol (ref. 17). Os Agg 2 e 3 são protectores em ratinhos contra provocação respiratória e colostro humano contendo anti-aglutinogénios também protegerá neste ensaio (ref. 19, 44, 45).

Vacinas de *pertussis* acelulares

A primeira vacina de *pertussis* acelular desenvolvida foi a vacina de duas componentes PT + FHA (JNIH 6) de Sato et al. (ref. 46). Esta vacina foi preparada por co-purificação de antigénios PT e FHA do sobrenadante de cultura de *B. pertussis* estirpe Tohama, seguido por desintoxicação química com formalina. Têm sido utilizadas com sucesso vacinas acelulares de diferentes fabricantes e com diferentes composições para imunizar crianças japonesas contra a tosse convulsa desde 1981 resultando numa diminuição drástica na incidência da doença (ref. 47). Ensaiaram-se a vacina JNIH 6 e a vacina de toxóide

PT mono-componente (JNIH 7) num grande ensaio clínico na Suécia em 1986. Os resultados indicaram menor eficácia relativamente à eficácia relatada de uma vacina de células completas, mas estudos de seguimento demonstraram que era mais eficaz contra doença moderada diagnosticada por métodos serológicos (ref. 48, 49, 50, 51). Contudo, haviam evidências para reversão para toxicidade de PT inactivada com formalina nestas vacinas. Verificou-se igualmente que estas vacinas protegiam contra a doença e não contra a infecção.

Estão presentemente a ser avaliadas e apresentam-se na tabela 1, várias novas vacinas de *pertussis* acelulares e de componentes *pertussis*, que incluem combinações de PT, FHA, P.69 e/ou aglutinogénios. Têm sido utilizadas várias técnicas de desintoxicação química de PT incluindo inactivação com formalina (ref. 46), glutaraldeído (ref. 52), peróxido de hidrogénio (ref. 53) e tetranitrometano (ref. 54).

Tétano

O tétano é uma infecção aguda causada por *Clostridium tetani*. A doença caracteriza-se por contracções musculares violentas e dolorosas acompanhadas por hipersensibilidade, hiper-reflexia e estimulação autonómica aumentada da(s) parte(s) do corpo afectada(s). Estímulos moderados podem causar espasmos musculares reflexos violentos. Pode ocorrer febre causada por espasmo muscular extremo. O tétano pode ser generalizado envolvendo a face, o pescoço, o abdómen e tronco, ou localizar-se numa parte específica do corpo (local de lesão). O envolvimento do músculo masseter da face resulta em trismo ou maxilar preso dando origem à expressão facial clássica conhecida como "riso sardónico" (ref. 78).

C. tetani existe como um organismo não patogénico no intestino de humanos e animais. Encontra-se igualmente o organismo em solo contaminado por fezes e pode sobreviver no solo durante anos como esporos infecciosos (ref. 79).

O tétano resulta do crescimento anaeróbico de *C. tetani* e produção de neurotoxina em feridas contaminadas. A infecção é causada pela introdução de materiais contaminados por organismos ou esporos em tecidos. O cenário mais habitual é

infecção através de uma lesão penetrante. Contudo, em muitos casos não é possível obter uma história da lesão. A presença de tecido necrótico ou isquémico facilita o crescimento do bacilo (ref. 78).

A prevenção da infecção é através de vacinação e por um bom cuidado das feridas incluindo limpeza cuidadosa e remoção de tecidos desvitalizados. Deve administrar-se aos indivíduos com feridas contaminadas e que falharam a série de vacinação, tanto a vacina do tétano como a imunoglobulina do tétano.

O tratamento da síndrome é principalmente de apoio e pode incluir apoio respiratório, administração de antitoxina de tétano e limpeza cuidadosa de feridas infectadas. Apesar dos cuidados médicos modernos, as taxas de casos fatais ainda são tão elevadas como 30 a 90% (ref. 79). Isto é especialmente verdade em idosos. A infecção natural nem sempre produz imunidade contra infecção adicional.

A prevenção de infecção por vacinação é o método mais eficaz de controlar a doença. Desde a introdução de vacinação universal, o tétano tornou-se extremamente raro em países desenvolvidos. Ocorrem casos quase exclusivamente em indivíduos que não completaram as suas séries de vacinações ou que não receberam doses de reforço apropriadas. Os indivíduos devem receber uma dose de reforço de dez em dez anos.

Difteria

A difteria é uma infecção aguda causada pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae*. O principal local de infecção é o tracto respiratório superior (nariz, faringe, laringe e traqueia) (ref. 80). A lesão característica e que resulta da citotoxina bacteriana, é constituída por manchas acinzentadas de pseudomembrana rodeadas por inflamação. Tal é acompanhado por linfoadenopatia cervical, inchaço e edema da garganta. Em casos graves o inchaço pode progredir até à obstrução (difteria laríngea). Outras complicações incluem miocardite, efeitos no sistema nervoso central (neuropatias craniana, motora e sensorial, tal como paralisia ascendente) e trombocitopenia. Outras membranas mucosas podem ser menos frequentemente afectadas. A apresentação clínica pode variar

desde infecção assintomática a multissistema fulminante e morte (ref. 79). As infecções cutâneas e de feridas com difteria são comuns nos trópicos e têm sido frequentemente relatadas na população indigente dos E.U.A.. O único reservatório de *C. diphtheriae* é o homem (ref. 79).

Pode ser efectuado um diagnóstico presumível por observação clínica das lesões características mas deve ser confirmado por exame bacteriano das lesões. Se existir uma forte suspeita clínica de difteria, deve ser imediatamente iniciado tratamento com antibióticos (penicilina ou eritromicina) e antitoxina de difteria, mesmo que o diagnóstico não tenha sido confirmado. Quanto mais se espera após o início dos sintomas clínicos, mais a mortalidade aumenta (ref. 80). As gamas de taxas de casos fatais vão de cinco a dez porcento apesar dos cuidados médicos modernos (ref. 79) e ocorrem principalmente em indivíduos muito jovens e nos idosos. A infecção natural nem sempre produz imunidade relativamente a infecção posterior (ref. 80).

A transmissão é por contacto directo com excreções ou descargas de um indivíduo infectado. Os indivíduos são contagiosos desde que se verifiquem bactérias nas excreções. Tal pode durar até quatro semanas após a infecção. A transmissão pode também ocorrer com materiais infectados (ref. 79). Recomenda-se o isolamento estrito de casos.

Raramente, os indivíduos podem tornar-se portadores e albergar os organismos até seis meses após infecção. Os portadores não imunizados devem ser rapidamente vacinados com a série completa. Por tratamento com antibióticos eliminam-se as capacidades portadora e de infecção dos casos em 4 dias (ref. 80).

Poliomielite

As vacinas de poliovírus tanto inactivada (IPV) como viva atenuada (OPV) têm sido eficazes no controlo da poliomielite a nível mundial. Encontra-se presentemente licenciada na Europa e no Canadá uma vacina combinada DPT-IPV que se demonstrou ser segura e eficaz em milhões de crianças em todo o mundo.

***Haemophilus influenzae* tipo b**

Anteriormente à disponibilidade de vacinas eficazes, a *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) era uma das principais causas de infecções sanguíneas invasivas de meningite em crianças pequenas e era a principal causa de meningite durante os primeiros 2 anos de vida (ref. 81). Aproximadamente 10% das vítimas de meningite por *Haemophilus influenzae* morrem apesar dos cuidados médicos. As sequelas permanentes são comuns nos sobreviventes. A imunização contra *Haemophilus influenzae* começou no Canadá em 1987 com uma vacina de polissacárido (polirribose-ribitolfosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b). Obteve-se imunogenicidade melhorada em crianças de 18 meses de idade e mais velhas com a introdução em 1988 de uma vacina que consistia de PRP conjugado com toxóide da difteria (PRP-D). Desde 1992, a imunização de bebés tem sido possível com o licenciamento de vacinas de conjugado PRP imunogénicas em bebés com menos de 1 ano de idade (PRP conjugado com toxóide de tétano ou PRP-T). A utilização destas vacinas conjugadas de *Haemophilus influenzae* tem sido associada com uma diminuição drástica da incidência de infecção invasiva por *Haemophilus* no Canadá e noutros locais (ref. 82). Dois estudos clínicos canadianos envolvendo cerca de 900 crianças em British Columbia e Alberta demonstraram que PRP-T liofilizada pode ser reconstituída com DPT (COMBIPACK) (ref. 83) ou com DPT-polio adsorvida (PENTA™) (ref. 84) adicionalmente ao diluente habitual de solução salina. Estudos clínicos envolvendo mais de 100 000 crianças em todo o mundo demonstraram a eficácia de PRP-T(ActHib™) liofilizada. Mais de 90% atingem níveis anti-PRP considerados como protectores (≥0,15 μg/ml) após 3 doses de PRP-T com início aos 2 meses ou após uma dose única de PRP-T administrada após os 12 meses de idade. A proporção que atinge níveis indicativos de protecção a longo prazo (>1,0 μg/ml) varia entre 70 e 100% dependendo do estudo. Têm sido vendidas milhões de doses de PRP-T no Canadá desde 1992. Os casos de progressão de infecção invasiva por *haemophilus* após vacinação com PRP-T são raros e podem estar associados com doenças tais como imunodeficiência (ref. 85).

Vacinas de combinação

Apesar de existirem muitos benefícios reais e potenciais nas vacinas que combinam antigénios para conferir protecção contra patogénios múltiplos, estas combinações podem ter um efeito prejudicial sobre a imunogenicidade das componentes individuais. As combinações dos toxóides de difteria e de tétano com vacinas de *pertussis* de células completas (DTP) têm estados disponíveis há mais de 50 anos e a resposta de anticorpos à combinação é melhor do que às componentes individuais, talvez como resultado de um efeito adjuvante da vacina de *pertussis* de células completas. As combinações DTP que também incluem vacina de poliovírus inactivada estão licenciadas em muitas jurisdições, apesar da resposta de anticorpos aos antigénios de *pertussis* poder ser diminuída por esta combinação (ref. 69 a 71). O efeito da combinação de vacinas DTP com vacina conjugada Hib tem sido variável. Estudos com DTP e PRPT francesas demonstraram segurança semelhante mas uma resposta de anticorpos diminuída a PRP (ref. 72 a 73) enquanto que estudos com uma vacina DTP e PRPT canadiana não mostrou qualquer efeito sobre a resposta PRP embora apresentassem menores aglutinogénios de *pertussis* e maior sensibilidade no local de injecção para o grupo de imunização combinada (ref. 74, 75).

Estão presentemente disponíveis dados sobre o efeito de combinar vacinas APDT com vacina conjugada Hib. Em bebés de dois meses de idade aos quais se administraram três doses de uma vacina de *pertussis* acelular-difteria-tétano (APDT) combinada com uma vacina conjugada Hib (PRP-T), a resposta de anticorpos a PRP foi significativamente inferior à do grupo ao qual foram administradas injecções separadas no mesmo dia (ref. 76). Relataram-se resultados semelhantes com outra vacina de *pertussis* acelular-difteria-tétano combinada com PRP-T cujas primeiras três doses foram administradas (ref. 77).

Contrariamente a outros estudos relatados, crianças imunizadas com a vacina combinada apresentaram uma resposta de anticorpos superior a PRP, difteria e vários dos antigénios de *pertussis* comparativamente com crianças às quais se administrou PRP numa visita separada. Podem existir várias

razões para a imunogenicidade semelhante ou melhorada destas vacinas quando administradas como uma injecção combinada em vez da imunogenicidade diminuída relatada com outros produtos. Nem todas as vacinas de *pertussis* acelulares e de componente *pertussis* são idênticas no seu teor antigénico, método de desintoxicação química, adjuvante ou conservante. Contudo, relatou-se imunogenicidade diminuía com vacinas de *pertussis* acelulares contendo PT, FHA e 69K (ref. 77) e contendo PT, FHA, 69K e fímbrias (ref. 76).

Verificou-se que a vacina APDT de cinco componentes analisada neste estudo tinha uma eficácia protectora de 85% (exemplo 5) (95% de I.C. 81/89) num ensaio clínico de fase III recentemente completado na Suécia sob os auspícios do National Institutes of Health (ref. 78).

As vacinas de combinação actualmente disponíveis comercialmente podem não conter formulações adequadas de antigénios adequados em formas imunogénicas apropriadas para atingir um nível de eficácia pretendido numa população humana susceptível a *pertussis*.

Gryhrs et al, resumo E-92, 95th General Meeting of the Society for Microbiology, Washington DC, EUA (que alegadamente teve lugar de 21 a 25 de Maio de 1995) relatam imunidade de células T em crianças vacinadas com PT desintoxicada com peróxido de hidrogénio numa vacina de combinação DTaP-IPV. O resumo não apresenta detalhes sobre a formulação para além da presença simpliciter de antigénios D e T, antigénios de *pertussis* acelulares e IPV.

Mallet et al, resumo 19, 14th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Elsinore, Dinamarca (que alegadamente teve lugar de 18 a 21 de Junho de 1996) relatam imunização primária com vacina combinada acelular DTaP-IPV-Act-HIB dada aos 2-3-4 ou 2-4-6 meses de idade. O resumo não apresenta detalhes sobre a formulação para além da presença simpliciter dos antigénios para D e T, antigénios de *pertussis* acelulares e IPV e o antigénio referido pela marca registada Act-HIB.

Begue et al, resumo 20, 14th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, supra, relata sobre a avaliação de uma dose de reforço de vacina DTPa-IPV, com ou sem Hib, comparativamente com vacina DTPw-IPV-Hib comercial. O resumo não apresenta detalhes sobre a formulação para além da presença simpliciter dos antigénios para D e T, antigénios de *pertussis* acelulares e/ou IPV/Hib.

Hronowski et al, resumo E78, 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, Geórgia, EUA (que alegadamente teve lugar de 16 a 20 de Maio de 1993) relatam sobre a imunogenicidade de uma nova vacina de conjugado de polissacárido de Hib-TT e as imunogenicidades das componentes individuais na vacina pentavalente Hib-TT + DTaP + IPV. O resumo refere que o polissacárido de cápside foi acoplado covalentemente ao transportador da proteína toxóide de tétano pelo método de aminação. Não são revelados detalhes relativamente à composição antigénica detalhada das vacinas em causa.

Seria desejável proporcionar vacinas de combinação eficazes incluindo componentes de *pertussis* acelulares contendo quantidades relativas seleccionadas de antigénios seleccionados.

O presente invento refere-se, tal como definido aqui infra, a vacinas de combinação ou multivalentes contendo componentes de vacina de *pertussis* acelular e métodos de sua utilização.

De acordo com um aspecto do presente invento, proporciona-se uma composição imunogénica multivalente para conferir protecção num hospedeiro contra doença provocada por infecção com *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, poliovírus e/ou *Haemophilus influenzae*, incluindo:

(a) toxóide de *pertussis*, hemaglutinina filamentosa, pertactina e aglutinogénios em forma purificada,

(b) toxóide de tétano,

(c) toxóide de difteria,

(d) poliovírus inactivado e opcionalmente,

(e) um conjugado de uma molécula transportadora seleccionada de toxóide de tétano e toxóide de difteria e um polissacárido da cápside do tipo *Haemophilus influenzae*, opcionalmente liofilizado

que é formulada como uma vacina para administração *in vivo* a um hospedeiro e em que cada dose simples humana do referido toxóide de *pertussis* está presente numa quantidade de 5 a 30 μg de azoto, em que a referida hemaglutinina filamentosa está presente numa quantidade de 5 a 30 μg de azoto, em que a referida pertactina está presente numa quantidade de 3 a 15 μg de azoto e os referidos aglutinogénios estão presentes numa quantidade de 1 a 10 μg de azoto.

A composição imunogénica é assim formulada como uma vacina para administração *in vivo* ao hospedeiro em que a imunogenicidade das componentes individuais não seja afectada por outras componentes individuais da composição.

A composição imunogénica pode conter adicionalmente um adjuvante, nomeadamente hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio.

Numa concretização específica, a composição imunogénica pode incluir toxóide de *pertussis*, hemaglutinina fimbrial, a proteína 69 kDa e aglutinogénios filamentosos de *Bordetella pertussis* a uma razão de peso de cerca de 20:20:5:3 tal com proporcionado por cerca de 20 μg de toxóide de *pertussis*, cerca de 20 μg de hemaglutinina filamentosa, cerca de 5 μg de aglutinogénios fimbriais e cerca de 3 μg de proteína 69 Kda numa dose humana única. Noutra concretização específica, a vacina pode incluir toxóide de *pertussis*, hemaglutinina filamentosa, a proteína 69 kDa e aglutinogénio fimbrial de *Bordetella pertussis* a uma razão de peso de 10:5:5:3 tal com proporcionado por cerca de 10 μg de toxóide de *pertussis*, cerca de 5 μg de hemaglutinina filamentosa, cerca de 5 μg de aglutinogénio fimbrial e cerca de 3 μg de proteína 69 kDa numa dose humana única. Numa concretização da composição imunogénica aqui proporcionada, a vacina contém cerca de 15 Lf de toxóide de difteria e cerca de 5 Lf de toxóide de tétano.

O poliovírus inactivado utilizado na composição imunogénica do invento inclui geralmente uma mistura de poliovírus inactivados dos tipos 1, 2 e 3. Tal mistura de poliovírus inactivados dos tipos 1, 2 e 3 pode ser utilizada nas composições:

cerca de 20 a cerca de 50 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 1;

cerca de 5 a cerca de 10 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 2;

cerca de 20 a cerca de 50 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 3 numa dose humana única. Numa formulação, tais misturas de tipos de poliovírus inactivados podem incluir:

cerca de 40 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 1

cerca de 8 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 2

cerca de 32 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 3 numa dose humana única.

A componente de molécula conjugada da composição imunogénica pode incluir um conjugado de toxóide de tétano ou toxóide de difteria e polirribose-ribitolfosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b. Tal molécula conjugada pode ser proporcionada numa forma liofilizada, que é reconstituída para administração por combinação com as outras componentes. A composição imunogénica pode conter o conjugado numa quantidade de cerca de 5 a cerca de 15 μg de PRP conjugado com cerca de 15 a cerca de 35 μg de toxóide de tétano, numa dose humana única. Numa formulação, utiliza-se o conjugado numa quantidade de cerca de 10 μg de PRP conjugado com cerca de 20 μg de toxóide de tétano.

Em tais concretizações específicas, as composições imunogénicas proporcionam um perfil de resposta imune para cada um dos antigénios de *pertussis* aí contidos e o perfil de resposta proporcionado pelas componentes acelulares é substancialmente equivalente ao produzido por uma vacina de *pertussis* de células completas.

Numa concretização preferida deste invento, proporciona-se uma composição de vacina multivalente incluindo, por dose de

0,5 ml, 20 μg de toxóide de *pertussis*, 20 μg de hemaglutinina filamentosa; 5 μg de fímbrias 2 e 3; 3 μg de proteína membranar pertactina; 15 Lf de toxóide de difteria; 5 Lf de toxóide de tétano; 40 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 1; 8 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 2; 1,5 μg de fosfato de alumínio.

Tal composição pode incluir adicionalmente, por dose de 0,5 ml, 10 μg de polissacárido de cápside polirribose-ribitolfosfato purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b, ligado covalentemente a 20 μg de toxóide de tétano. Adicionalmente, tais composições podem conter, por dose de 0,5 ml, 2-fenoxietanol a 0,6%.

Num aspecto adicional do invento, proporciona-se um método de imunizar um hospedeiro contra múltiplas doenças incluindo administração ao hospedeiro, que pode ser humano, de uma quantidade imunologicamente eficaz da composição imunogénica ou vacina tal como aqui proporcionada.

As vantagens do presente invento incluem uma vacina multivalente que pode conferir protecção contra uma gama de doenças pediátricas comuns de um modo seguro e eficaz. A capacidade de proporcionar uma única vacinação contra múltiplas doenças sem interferência entre as respostas imunogénicas dos diferentes imunogénios, é benéfica.

O presente invento será compreendido adicionalmente a partir da Descrição Detalhada e Exemplos seguintes com referência ao desenho incluso no qual:

A figura 1 é um diagrama de fluxo esquemático de um procedimento para o isolamento de uma preparação de aglutinogénio de uma estirpe de *Bordetella*.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Preparação de aglutinogénio

Relativamente à figura 1, ilustra-se um diagrama de fluxo de um método para preparar uma preparação de aglutinogénio de uma estirpe de *Bordetella*. Tal como se pode observar na

figura 1, extrai-se uma pasta celular de *Bordetella* contendo os aglutinogénios, tal como pasta celular de *B. pertussis* com, por exemplo, um tampão contendo ureia, tal como fosfato de potássio 10 mM, NaCl 150 mM e ureia 4 M, para extrair selectivamente os aglutinogénios da pasta celular para produzir um primeiro sobrenadante (sp1) contendo aglutinogénios e um primeiro precipitado residual (ppt1). Separa-se o primeiro sobrenadante (sp1) do primeiro precipitado residual (ppt1), tal como por centrifugação. Rejeita-se o precipitado residual (ppt1). O sobrenadante clarificado (sp1) pode ser então concentrado e diafiltrado contra, por exemplo, fosfato de potássio 10 mM/ NaCl 150 mM /Triton X-100 a 0,1% utilizando, por exemplo, um filtro de membrana NMWL de 100 a 300 kDa.

O primeiro sobrenadante é então incubado a uma temperatura e durante um intervalo de tempo necessário para produzir um sobrenadante clarificado (sp2) contendo aglutinogénios e um segundo precipitado (ppt2) que é rejeitado, contendo contaminantes não aglutinogénio. Constituem temperaturas adequadas cerca de 50°C a cerca de 100°C, incluindo cerca de 75°C a cerca de 85°C e constituem tempos de incubação adequados cerca de 1 a cerca de 60 minutos. Concentra-se então o sobrenadante clarificado através de, por exemplo, adição de polietilenoglicol de peso molecular de cerca de 8000 (PEG 8000) para uma concentração final de cerca de 4,5 ± 0,2% e agitação suave durante um mínimo de cerca de 30 minutos para produzir um terceiro precipitado (ppt3) que pode ser recolhido por centrifugação. O sobrenadante sp3 remanescente é rejeitado.

Este terceiro precipitado (ppt3) é extraído com, por exemplo, um tampão incluindo fosfato de potássio 10 mM/NaCl 150 mM para proporcionar a solução em bruto contendo aglutinogénio fimbrial. Pode adicionar-se fosfato de potássio 1 M à solução fimbrial em bruto para a tornar cerca de 100 mM relativamente a fosfato de potássio. Alternativamente, o sobrenadante clarificado de aglutinogénios fimbriais tratados pelo calor pode ser purificado sem precipitação por cromatografia de filtração em gel utilizando um gel, tal como Sepharose CL6B. Os aglutinogénios fimbriais na solução em bruto são seguidamente purificados por cromatografia em

coluna, tal como, passando através de uma coluna de sílica PEI, para produzir a preparação de aglutinogénio fimbrial no eluato.

Este eluato contendo aglutinogénio fimbrial pode ser concentrado adicionalmente e diafiltrado contra, por exemplo, um tampão contendo fosfato de potássio 10 mM/NaCl 150 mM utilizando uma membrana NMWL de 100-300 kDa. A preparação de aglutinogénio pode ser esterilizada por filtração através de um filtro de membrana ≤0,22 μM, para proporcionar a preparação de aglutinogénio fimbrial purificado final contendo aglutinogénio fimbrial 2 e 3 substancialmente isento de aglutinogénio 1. A razão de peso entre Agg 2 e Agg 3 pode ser desde cerca de 1,5:1 a cerca de 2:1. As vacinas podem conter outros imunogénios de *Bordetella* purificados incluindo hemaglutinina filamentosa, a proteína de membrana externa 69 kDa e toxina de *pertussis* ou um seu toxóide, incluindo análogos de PT desintoxicados geneticamente tal como descrito em, por exemplo, ref. 68.

Os outros imunogénios de *Bordetella*, toxina de *pertussis* (incluindo seus análogos desintoxicados geneticamente, tal como descrito em, por exemplo, Klein et al, patente U.S. nº 5 085 862 cedida a este cessionário e aqui incorporada por referência a esta), FHA e a proteína 69 kDa podem ser produzidos sob forma purificada por vários métodos tal como descrito infra.

Purificação de PT

A PT pode ser isolada do sobrenadante de cultura de uma estirpe de *B. pertussis* utilizando métodos convencionais. Por exemplo, pode ser utilizado o método de Sekura et al (ref. 55). Isola-se PT primeiramente por absorção do sobrenadante de cultura numa coluna contendo a matriz de gel de corante-ligando, Affi-Gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia). Elui-se PT desta coluna por concentração salina elevada, tal como cloreto de magnésio 0,75 M e após remoção deste sal passa-se através de uma coluna de matriz de afinidade fetuína-Sepharose composta de fetuína ligada a Sepharose activada por brometo de cianogénio. Elui-se PT da coluna de fetuína utilizando sal de magnésio 4 M.

Alternativamente, pode utilizar-se o método de Irons et al (ref. 56). Adsorve-se o sobrenadante da cultura numa coluna de Sepharose 4B activada com CNBr à qual se liga primeiramente haptoglobina de modo covalente. A PT liga-se ao absorvente a pH 6,5 e é eluída de uma coluna utilizando um tampão Tris 0,1 M/NaCl 0,5 M por alteração por etapas até pH 10.

Alternativamente, pode utilizar-se o método descrito em patente U.S. nº 4 705 686 concedida a Scott et al a 10 de Novembro de 1987 e aqui incorporada por sua referência. Neste método passam-se sobrenadantes de cultura ou extractos celulares de *B. pertussis* através de uma coluna de uma resina de permuta aniónica de capacidade suficiente para adsorver endotoxina mas permitindo fluxo de antigénios de *Bordetella* através da coluna, ou separa-se de outro modo da endotoxina.

Alternativamente, a PT pode ser purificada por utilização de cromatografia de perlite, tal como descrito em patente EP nº 336 736, cedida ao seu cessionário e aqui incorporada por referência a esta.

Desintoxicação de PT

Desintoxica-se PT para remover actividades indesejáveis que poderiam causar reacções secundárias da vacina final. Pode utilizar-se qualquer um entre vários métodos de desintoxicação química convencional, tal como o tratamento com formaldeído, peróxido de hidrogénio, tetranitrometano ou glutaraldeído.

Por exemplo, pode desintoxicar-se PT com glutaraldeído utilizando uma modificação do procedimento descrito em Munoz et al (ref. 57). Neste processo de desintoxicação incuba-se PT purificada numa solução contendo solução salina tamponada de fosfato 0,01 M. Torna-se a solução 0,05% em glutaraldeído e incuba-se a mistura à temperatura ambiente durante duas horas e seguidamente torna-se 0,02 M em L-lisina. Incuba-se adicionalmente a mistura durante duas horas à temperatura ambiente e seguidamente dialisa-se durante dois dias contra PBS 0,01 M. Numa concretização específica, pode utilizar-se o processo de desintoxicação de patente EP nº 336 736. Sucintamente, pode desintoxicar-se PT com glutaraldeído como se segue:

Dilui-se PT purificado em fosfato de potássio 75 mM a pH 8,0 contendo cloreto de sódio 0,22 M, com um volume igual de glicerol para concentrações de proteína de aproximadamente 50 a 400 μg/ml. Aquece-se a solução a 37°C e desintoxica-se por adição de glutaraldeído para uma concentração final de 0,5% (p/v). Mantém-se a mistura a 37°C durante 4 h e seguidamente adiciona-se ácido aspártico (1,5 M) para uma concentração final de 0,25 M. Incuba-se a mistura à temperatura ambiente durante 1 hora e seguidamente diafiltra-se com 10 volumes de fosfato de potássio 10 mM a pH 8,0 contendo cloreto de sódio 0,15 M e glicerol a 5% para reduzir o glicerol e para remover o glutaraldeído. Esteriliza-se o toxóide PT por filtração através de uma membrana de 0,2 μM.

Caso se utilizem técnicas recombinantes para preparar uma molécula mutante de PT que apresente pouca ou nenhuma toxicidade, para utilização como uma molécula desintoxicada quimicamente, a desintoxicação química não é necessária.

Purificação de FHA

A FHA pode ser purificada do sobrenadante de cultura essencialmente como descrito por Cowell et al (ref. 58).

Podem utilizar-se promotores de crescimento, tal como beta-ciclodextrinas metiladas, para aumentar o rendimento de FHA nos sobrenadantes de cultura. Aplica-se o sobrenadante de cultura a uma coluna de hidroxilapatite. A FHA é adsorvida à coluna mas PT não. A coluna é lavada extensamente com Triton X-100 para remover endotoxina. A FHA é então eluída utilizando NaCl 0,5 M em fosfato de sódio 0,1 M e caso necessário, passada através de uma coluna de fetuína-Sepharose para remover PT residual. Purificação adicional pode envolver passagem através de uma coluna de Sepharose CL-6B.

Alternativamente, pode purificar-se FHA utilizando anticorpos monoclonais contra o antigénio, em que os anticorpos são ligados a uma coluna de afinidade activada com CNBr (ref. 59).

Alternativamente, pode purificar-se FHA por utilização de cromatografia de perlite tal como descrito na supra mencionada EP 336 736.

Purificação da proteína de membrana externa de 69 kDa (pertactina)

A proteína de membrana externa de 69 kDa (69K ou pertactina) pode ser recuperada de células bacterianas primeiramente por inactivação das células com um agente bacteriostático, tal como timerosal, tal como descrito em EP 484 621 publicada e aqui incorporada por sua referência.

Suspendem-se as células inactivadas num meio aquoso, tal como PBS (pH 7 a 8) e submetem-se a extracção repetida a temperatura elevada (45 a 60°C) com arrefecimento subsequente para temperatura ambiente ou 4°C. As extracções libertam a proteína 69K das células. O material contendo a proteína 69K é recolhido por precipitação e passado através de uma coluna Affi-gel Blue. Elui-se a proteína 69K com uma concentração elevada de sal, tal como cloreto de magnésio 0,5 M. Após diálise, passa-se através de um suporte de electrofocagem.

Alternativamente, a proteína 69 kDa pode ser purificada a partir do sobrenadante de cultura de uma cultura de *B. pertussis*, tal como descrito em pedido PCT publicado WO 91/15505, no nome deste cessionário e aqui incorporado como sua referência. Tal método é preferido dado que a pertactina proporciona-se isenta de materiais cromatográficos de corante de adenilato-ciclase.

Descrevem-se outros métodos de purificação apropriados da proteína de membrana externa de 69 kDa de *B. pertussis* em patente U.S. nº 5 276 142, concedida a Gotto et al em 4 de Janeiro de 1984 e em patente U.S. nº 5 101 014, concedida a Burns a 31 de Março de 1992.

Outras componentes do invento

As vacinas do invento também contêm imunogénios não *Bordetella* incluindo toxóide de tétano, toxóide de difteria, poliovírus inactivado (IPV) e opcionalmente um conjugado de

toxóide de difteria ou toxóide de tétano e um polissacárido da cápside de *Haemophilus influenzae* tipo b. Outras componentes potenciais das vacinas multicomponentes incluem proteínas da membrana externa de *Haemophilus*, antigénios de superfície de hepatite B, papeira, sarampo e rubéola.

Os conjugados do toxóide de tétano ou toxóide de difteria e o polissacárido de cápside de Hib podem ser formados por isolamento de polirribose-ribitolfosfato (PRP) isolado de *H. influenzae* tipo b, derivatização de PRP para proporcionar uma di-hidrazida de ácido adípico e conjugação de modo covalente a toxóide de tétano ou toxóide de difteria para proporcionar conjugados PRP-T ou PRP-D, respectivamente.

Cada um dos antigénios é absorvido individualmente a um adjuvante, tal como fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio, denominados colectivamente como alúmen, para proporcionar uma produção conveniente e rápida de vacinas contendo quantidades relativas seleccionadas destes antigénios nas vacinas tal como aqui proporcionadas.

Formulações de vacinas multivalentes seleccionadas

Em concretizações seleccionadas, o invento proporciona vacinas com as características seguintes (as μg de proteínas aqui utilizadas baseiam-se em resultados de ensaio Kjedahl efectuados com concentrados purificados e expressam-se como μg de azoto de proteína), podendo todas ser administradas por injecção intramuscular:

(a) $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID)

Uma formulação inclui uma combinação de vacina de componente *pertussis* (CP) combinada com toxóides de difteria (DI) e tétano (T) e poliovírus inactivados (mIPV) e denomina-se $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID). Os poliovírus cultivados em células MRC-5 designam-se mIPV ao passo que os poliovírus cultivados em células vero denominam-se IPV ou vIPV. Pode utilizar-se indiferentemente nas formulações qualquer um dos materiais de poliovírus inactivados.

Cada dose humana de 0,5 ml de $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID) foi formulada de modo a conter cerca de:

20 μg de toxóide de *pertussis* (PT)
20 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 μg de aglutinogénios fimbriais 2 e 3 (FIM)
3 μg de proteína de membrana externa pertactina (69 kDa)

15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano

40 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 1
8 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 2
32 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 3

1,5 mg de fosfato de alumínio

0,6% 2-fenoxietanol, como conservante.

(b) $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID) + PRP-T:

Outra formulação inclui uma combinação de vacina de componente *pertussis* (CP) combinada com toxóides de difteria (D) e tétano (T) e poliovírus inactivado (mIPV) denominado $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID) e utiliza-se para reconstituir PRP-T liofilizado. A composição resultante contém, por dose de 0,5 ml, cerca de:

20 μg de toxóide de *pertussis* (PT)
20 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 μg de aglutinogénios fimbriais 2 e 3 (FIM)
3 μg de proteína de membrana externa pertactina (69 kDa)

15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano

10 μg de polissacárido de cápside polirribose-ribitolfosfato (PRP) purificado de *Haemophilus influenzae* tipo b ligado covalentemente a 20 μg de toxóide de tétano

40 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 1
8 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 2
32 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 3

1,5 mg de fosfato de alumínio

0,6% 2-fenoxietanol.

(c) $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV (HYBRID):

Uma formulação adicional inclui uma combinação de vacina de componente *pertussis* (CP) combinada com toxóides de difteria (D) e tétano (T), poliovírus inactivado (mIPV) e PRP-T e denomina-se $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV (HYBRID). Cada dose humana de 0,5 ml desta composição, contém cerca de:

20 μg de toxóide de *pertussis* (PT)
20 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 μg de aglutinogénios fimbriais 2 e 3 (FIM)
3 μg de proteína de membrana externa pertactina (69 kDa)

15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano

10 μg de polissacárido de cápside polirribose-ribitolfosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b ligado covalentemente a 20 μg de toxóide de tétano

40 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 1
8 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 2
32 unidades de antigénio D de poliovírus tipo 3

1,5 mg de fosfato de alumínio

0,6% 2-fenoxietanol.

Ensaios clínicos

(a) Vacina de componente *pertussis* DTP

Efectuaram-se vários ensaios clínicos em humanos tal como aqui descrito para estabelecer a segurança, não

reactogenicidade e utilidade de vacinas de componente *pertussis* contendo aglutinogénios fimbriais preparadas tal como aqui descrito, para protecção contra *pertussis*. Nomeadamente, obtiveram-se respostas imunes a cada um dos antigénios contidos nas vacinas (tal como apresentado, por exemplo, na tabela 3 infra). Analisou-se uma vacina de *pertussis* multivalente em particular, $CP_{10/5/5/3}DT$ num ensaio clínico de grandes dimensões controlado por placebo, multicentro, duplamente randomizado, numa população humana em risco para estimar a eficácia da vacina contra *pertussis* típica.

A definição de caso para doença *pertussis* típica foi:

Vinte e um dias ou mais de tosse espasmódica,
e quer
B. pertussis confirmado por cultura,
quer
evidência serológica de infecção específica por *Bordetella* indicada por um aumento de 100% de anticorpo IgG ou IgA em ELISA relativamente a FHA ou PT em soros emparelhados,
ou
no caso de ausência de dados serológicos,
a criança em estudo esteve em contacto numa casa com um caso de *B. pertussis* confirmado por cultura com manifestação de tosse no prazo de 28 dias antes ou depois do início da tosse na criança em estudo.

Os resultados deste estudo mostraram que $CP_{10/5/5/3}DT$ apresentava uma eficácia de cerca de 85% na prevenção de *pertussis* tal como definido na definição de caso para doença *pertussis* típica descrita supra. No mesmo estudo, uma vacina de *pertussis* acelular de duas componentes contendo apenas PT e FHA apresentou uma eficácia de cerca de 58% ($PT_{25}.FHA_{25}.DT$) e uma vacina de *pertussis* de células completas (DTP) apresentou uma eficácia de cerca de 48% (consultar tabela 4 infra). Adicionalmente, a vacina $CP_{10/5/5/3}DT$ evitou *pertussis* atenuada definida como tosse com pelo menos um dia de duração com uma eficácia de cerca de 77%. Nomeadamente, o perfil de resposta imune obtido foi substancialmente o mesmo que o obtido após imunização com vacinas de *pertussis* de células completas que se relatam como sendo altamente eficazes contra *pertussis*.

(b) Vacina multivalente DPT-PRP-T-IPV

(I) A segurança e imunogenicidade de vacinas de componente *pertussis* em combinação com toxóide de difteria e toxóide de tétano adsorvidos, vacina *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide de tétano e vacina de poliomielite inactivada cultivada em células vero ($CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV) foram comparadas com vacina de *pertussis* de células completas (a) em combinação com toxóides de difteria e de tétano adsorvidos e vacina de poliomielite inactivada, (b) em combinação com toxóides de difteria e de tétano adsorvidos e vacina de poliomielite inactivada cultivada em células MRC-5 (DPT-polio adsorvida) utilizada para reconstituir vacina liofilizada de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide de tétano (PENTA™), ou (c) vacina de componente *pertussis* em combinação com toxóides de difteria e de tétano adsorvidos e vacina de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide de tétano e vacina de poliomielite inactivada cultivada em células MRC-5 ($CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV) administradas separadamente ou utilizadas para reconstituir vacina liofilizada de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide de tétano (PRP-T) em crianças de 2, 4, 6 e 18 meses de idade.

Este ensaio controlado randomizado abrangeu 897 bebés de dois meses de idade que receberam um dos oito ramos de vacinas diferentes: $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV (líquido); $CP_{20/20/5/3}$DT administrada concomitantemente mas num local diferente de PRP-T; ou a vacina de controlo, DPT-Polio de células completas utilizada para reconstituir PRP-T (PENTA™).

Todas as vacinas em estudo foram bem toleradas. Não se observaram diferenças significativas nas taxas de reacção entre os dois tipos de combinações de *pertussis* recombinantes. As crianças que receberam a $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPv combinada utilizada para reconstituir PRP-T apresentaram taxas ligeiramente mais elevadas de reacções locais comparativamente com os mesmos produtos administrados em locais diferentes. Todas as combinações de componente *pertussis* apresentaram taxas consistentemente inferiores de reacções locais e sistémicas do que a combinação de células completas. As diferenças de taxas de reacção entre vacinas de componente

pertussis e de células completas foi mais aparente nas 24 horas imediatamente após a vacinação.

Ambas as combinações de componente *pertussis* apresentaram respostas excelentes a todos os antigénios. Em todas as situações, as respostas *pertussis* PT, FHA e pertactina foram superiores às respostas observadas em combinações de células completas. Não se observaram diferenças significativas entre combinações de componentes e de células completas. Não se observaram diferenças significativas entre formulações de componentes e de células completas para anti-PRP, difteria e polios 1 e 2. Ambas as formulações de componente *pertussis* apresentaram respostas ao tétano mais elevadas do que PENTA™. Ambas as formulações de componente apresentaram respostas serológicas semelhantes para todos os antigénios excepto polio 3, para a qual $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produziu respostas mais elevadas do que $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV. O método de administração não afectou as respostas serológicas a qualquer dos antigénios com excepção de tétano. Em ambos os grupos combinados e separados, 100% das crianças encontravam-se protegidas (>0,01 EU/ml) contra o tétano após 3 doses da vacina.

De modo mais importante, todos os grupos de vacina apresentaram boas respostas a PRP-T com 98,3% das crianças atingindo níveis >0,15 μg/ml e mais de 86,1% das crianças atingindo níveis >1,0 μg/ml. Estes números são comparáveis aos observados em estudos anteriores nos quais se utilizou vacina de *pertussis* de células completas com PRP-T.

As respostas serológicas obtidas e descritas supra apresentam-se nas tabelas 5 a 7 (H = híbrido).

(II) A segurança e imunogenicidade de vacinas de componente *pertussis* em combinação com toxóide de difteria e toxóide de tétano adsorvidos e vacina de poliomielite inactivada cultivada em células MRC-5 ($CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV) administrada separadamente ou utilizada para reconstituir vacina de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide de tétano (PRP-T) foram comparadas com vacina de *pertussis* de células completas em combinação com toxóides de difteria e de tétano adsorvidos e vacina de poliomielite inactivada

cultivada em células MRC-5 (DPT-polio adsorvido) utilizada para reconstituir vacina liofilizada de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide de tétano (PENTA™) em crianças com 18 a 19 meses de idade.

Este estudo com cinco ramos incluiu um ramo de controlo de células completas PENTA™ e $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T. Ao quinto grupo administrou-se $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV concomitantemente mas num local diferente de PRP-T. Quatrocentos e oitenta e nove indivíduos receberam vacina aos 18-19 meses de idade, dos quais 466 (95%) completaram o estudo de acordo com o protocolo. $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T apresentou significativamente menos reacção que PENTA™ nomeadamente nas primeiras 24 horas após vacinação. O produto reconstituído apresentou taxas de reacções locais ligeiramente mais elevadas do que o produto administrado separadamente.

PENTA™ produziu respostas polio 1 mais elevadas que $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T. Não se observaram diferenças significativas para anti-PRP, difteria, aglutinina *pertussis*, fímbrias, polio 2 ou polio 3. $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produziu respostas serológicas de *pertussis* PT, FHA e pertactina significativamente mais elevadas. $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizada para reconstituir PRP-T produziu respostas serológicas consistentes relativamente a todos os antigénios ensaiados. Não se observaram diferenças significativas entre $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV administrada separadamente relativamente à utilizada para reconstituir PRP-T com excepção de antitoxina de tétano (6,78 contra 4,91 EU/ml).

Este estudo demonstrou que $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produziu respostas serológicas consistentes em três lotes e foi mais imunogénico do que PENTA™ para respostas *Pertussis*. $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV também produziu taxas significativamente inferiores de reacções locais e sistémicas do que PENTA™.

(III) A segurança e imunogenicidade de vacinas de componente *pertussis* em combinação com toxóide de difteria e toxóide de tétano adsorvidos e vacina de poliomielite

inactivada cultivada em células MRC-5 ($CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV) foram comparadas com vacina de *pertussis* de células completas em combinação com toxóides de difteria e de tétano adsorvidos e vacina de poliomielite inactivada cultivada em células MRC-5 (DPT-polio adsorvido) em crianças com 4 a 6 anos de idade.

Atribuíram-se cento e sessenta e quatro indivíduos aleatoriamente numa razão de 4 para 1 para receberem quer $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (n=131), quer DPT-Polio (n=33). Não ocorreram efeitos adversos significativos ou graves durante o estudo. $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV apresentou taxas consistentemente mais baixas tanto de reacções locais como sistémicas nomeadamente no período de 0 a 24 horas. As reacções locais foram comuns em ambos os grupos com 97% de recebedores de DPT-Polio e 76,9% de recebedores de $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV apresentando alguma reacção local no período de 0 a 24 horas. As reacções locais de $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV foram habitualmente fracas ou moderadas. Contrariamente, mais de metade dos recebedores de DPT-Polio apresentaram reacções locais classificadas como graves. A sensibilidade no local de injecção desapareceu habitualmente em 72 horas mas a vermelhidão ou inchaço tiveram tendência a persistir bem além do período de 24 a 72 horas.

As reacções sistémicas no período de 0 a 24 horas foram menos comuns em recebedores de $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (38,5%) do que em recebedores de DPT-Polio (90,9%). As reacções sistémicas no período de 24-72 horas não foram comuns em ambos os grupos.

As respostas de difteria, tétano e polio 2 e 3 foram comparáveis entre as duas vacinas. Os recebedores de DPT-Polio apresentaram uma resposta a polio 1 significativamente mais elevada (15 462) do que os recebedores de $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (10 903). Todos os indivíduos apresentaram respostas excelentes e seriam considerados como protegidos contra as respectivas doenças. As respostas serológicas a todos os antigénios de *pertussis* foram significativamente superiores em recebedores de $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV.

(IV) A segurança e imunogenicidade da vacina de componente *pertussis* em combinação com toxóide de difteria e toxóide de tétano adsorvidos, vacina de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugada com toxóide de tétano e vacina de poliomielite

inactivada cultivada em células MRC-5 ($CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-mIPV) foram comparadas com vacina de *pertussis* de células completas em combinação com toxóides de difteria e de tétano adsorvidos e vacina de poliomielite inactivada cultivada em células MRC-5 (DPT-polio adsorvido) utilizada para reconstituir vacina liofilizada de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide de tétano (PENTA™) ou vacina de componente *pertussis* em combinação com toxóide de difteria e toxóide de tétano adsorvidos e vacina de poliomielite inactivada cultivada em células MRC-5 ($CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV) utilizada para reconstituir vacina liofilizada de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide de tétano (PRP-T) em crianças com 18 a 19 meses de idade.

O objectivo deste estudo de três ramos randomizado controlado e singularmente cego foi avaliar a segurança e imunogenicidade de duas novas combinações de *pertussis* acelulares, $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV e $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizadas para reconstituir PRP-T, com PENTA™ (*pertussis* de células completas DPT polio utilizada para reconstituir PRP-T) em crianças de 18 a 19 meses de idade. Participaram um total de 99 crianças; 33 em cada um dos três grupos de vacinação, das quais 97 (98%) completaram o estudo de acordo com o protocolo.

Neste estudo não se observaram reacções graves. Os recebedores de PENTA™ apresentaram uma probabilidade significativamente maior de apresentar reacções locais ou sistémicas moderadas ou graves, do que os recebedores das outras duas vacinas. As diferenças foram mais pronunciadas às 24 horas e atingiram significância estatística relativamente a febre, vermelhidão, inchaço, sensibilidade, agitação nervosa, actividade diminuída e comer menos. As reacções foram tendencialmente fracas em crianças que receberam combinações de componente *pertussis*. Não se observaram diferenças significativas nas taxas de reacção entre as duas formulações de componente *pertussis* apesar de ser mais frequentemente observada agitação nervosa às 24 horas nos recebedores de $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T relativamente a $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV (18% contra 3%).

As respostas serológicas foram satisfatórias com 100% dos participantes a atingirem níveis considerados protectores para

antitoxina de difteria (≥0,01 UI/ml), antitoxina de tétano (≥0,01 UI/ml) e anti-PRP (≥1,0 μg/ml). Observaram-se anticorpos neutralizadores detectáveis para polio dos tipos 1, 2 e 3 em todos os participantes após imunização.

As respostas de difteria foram mais elevadas em recebedores PENTA™ o que reflecte o conteúdo de antigénios mais elevado desta vacina (25 Lf contra 15 Lf).

Os anticorpos *pertussis* foram consistentemente mais elevados nas combinações de duas componentes *pertussis* relativamente a PENTA™ atingindo significância estatística para as respostas GMT anti-PT, anti-FHA e anti-pertactina. Os anticorpos anti-fimbrial e de aglutinação de *pertussis* foram também mais elevados nos recebedores de componente *pertussis* apesar das diferenças não atingirem significância estatística.

Em resumo, este estudo mostrou que as duas combinações de *pertussis* acelulares $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizadas para reconstituir PFP-T e $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV foram comparáveis e produziram, de modo satisfatório, taxas de reacção baixas e respostas serológicas elevadas quando administradas como reforço a crianças com 18 a 19 meses de idade.

(V) A segurança e imunogenicidade de vacina de componente *pertussis* em combinação com toxóide de difteria e toxóide de tétano adsorvidos ($CP_{20/20/5/3}$DT) sozinha ou em combinação com um ou dois poliovírus inactivados, um mIPV, cultivado em células MRC-5 e a outra vIPV cultivada em células vero, ou vacina de poliomielite oral (OPV) em crianças de 17 a 19 meses de idade.

Este estudo de cinco ramos foi concebido para analisar a interacção entre $CP_{20/20/5/3}$DT e dois IPV (cultivados em células Vero ou em células MRC-5). Combinaram-se ambos os IPV num único produto líquido com $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV e $CP_{20/20/5/3}$DT-vIPV ou foram administrados concomitantemente mas num local de injecção diferente ($CP_{20/20/5/3}$DT+mIPV e $CP_{20/20/5/3}$DT+vIPV). Um quinto grupo de estudo recebeu $CP_{20/20/5/3}$DT e OPV concomitantemente. Todos os indivíduos receberam PRP-T numa retirada de sangue após imunização. As respostas anti-PRP não foram avaliadas neste estudo.

CONCEPÇÃO DO ESTUDO

NÚMERO	VISITA 1 (17-19 meses)	VISITA 2 (+ 1 mês)
85	1. $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (1 injecção)	PRP-T
85	2. $CP_{20/20/5/3}$DT+mIPV (2 injecções)	PRP-T
85	3. $CP_{20/20/5/3}$DT-vIPV (1 injecção)	PRP-T
85	4. $CP_{20/20/5/3}$DT+vIPV (2 injecções)	PRP-T
85	5. $CP_{20/20/5/3}$DT+OPV (1 injecção)	PRP-T

De um modo geral, não se observou diferença nas taxas de reacções adversas relatadas após as vacinas de poliomielite inactivadas derivadas de células MRC-5 ou de células vero, quer a vacina fosse administrada como uma injecção independente ou combinada com a vacina $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID).

Não se observaram diferenças significativas entre os grupos para PT, FHA e pertactina. As respostas em crianças recebendo $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) e OPV foram ligeiramente superiores mas não de modo significativo relativamente a crianças recebendo $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) e IPV de células Vero para FIM, aglutinina de *pertussis*, difteria e tétano. As respostas de polio foram geralmente comparáveis ou superiores em crianças recebendo uma vacina IPV relativamente a uma vacina OPV. Todos os indivíduos, com excepção de um deles, apresentaram aglutinina de *pertussis* >1:64. Todos os indivíduos, com excepção de um deles, atingiram teores de antitoxina de difteria ≥ 0,1 U/ml e todos atingiram teores de antitoxina de tétano ≥ 0,1 EU/ml.

Os resultados deste estudo demonstraram que $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) em combinação com IPV (quer de células MRC-5, quer de células Vero) é seguro e imunogénico em crianças com 17 a 19 meses de idade. As vacinas de combinação foram pelo menos tão imunogénicas como a vacina administrada como injecções independentes e nalguns casos mais imunogénica. A combinação da vacina como uma única injecção não se encontrou associada a um aumento significativo de reacções adversas locais. Não se detectaram diferenças substanciais nas reacções adversas ou resposta imune às duas preparações IPV quer como injecções

independentes, quer como produtos combinados. A inclusão de IPV não aumentou a taxa de reacções adversas comparativamente com $CP_{20/20/5/3}DT$ (HYBRID) administrada sozinha (ou seja, com OPV).

Os resultados serológicos obtidos no estudo encontram-se resumidos na tabela 8 (H = híbrido).

(VI) (para comparação) A segurança e imunogenicidade de vacina de componente *pertussis* em combinação com toxóide de difteria e toxóide de tétano adsorvidos ($CP_{20/20/5/3}DT$ e $CP_{10/5/5/3}DT$), sozinha ou em combinação com vacina de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugada, foram determinadas em crianças com 17 a 19 meses de idade.

Este estudo de seis ramos foi concebido para analisar a interacção entre formulações de componente *pertussis* tanto clássicas ($CP_{10/5/5/3}DT$) como híbridas ($CP_{20/20/5/3}DT$) e vacina de conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo b (PRP-T) em crianças com 18 a 19 meses de idade.

Utilizaram-se três calendarizações nas quais (a) utilizaram-se cada uma das vacinas de componente *pertussis* para reconstituir PRP-T, (b) administraram-se concomitantemente mas num local separado de PRP-T ou (c) administrou-se PRP-T 1 mês após a vacina de componente *pertussis*. Todas as crianças receberam OPV na primeira visita e foram iniciadas com a mesma vacina de componente *pertussis* aos 2, 4 e 6 meses de idade. Todas as crianças tinham participado previamente no grande estudo de segurança destas duas formulações de vacina.

Estudaram-se um total de 545 indivíduos, dos quais 542 (99%) completaram o estudo.

CONCEPÇÃO DO ESTUDO

NÚMERO	VISITA 1 (17-19 meses)		VISITA 2 (+1 mês)	VISITA 3 (+2 meses)
154	1. $CP_{20/20/5/3}DT$ utilizada para reconstituir PRP-T	SANGUE + OPV	Sangue	-
152	$CP_{20/20/5/3}DT$ dada concomitantemente com PRP-T OPV		Sangue	-
159	$CP_{20/20/5/3}DT$		PRP-T	Sangue
27	$CP_{10/5/5/3}DT$ utilizada para reconstituir PRP-T	SANGUE + OPV	Sangue	-
29	$CP_{10/5/5/3}DT$ dada concomitantemente com PRP-T OPV		Sangue	-
21	$CP_{10/5/5/3}DT$		PRP-T	Sangue

As respostas serológicas foram geralmente mais elevadas relativamente à maioria dos antigénios quando se administravam uma vacina de componente *pertussis* de combinação e PRP-T no mesmo dia comparativamente com dias separados (consultar tabela 9).

É importante salientar que as respostas anti-PRP não foram diminuídas quando se administrou PRP-T separadamente relativamente a combinado com uma vacina de componente *pertussis* de combinação no mesmo dia. Os GMT após imunização de crianças às quais foram administradas as vacinas em dias separados foram significativamente inferiores. Observaram-se diferenças de respostas anti-PRP entre injecções combinadas e separadas quando os indivíduos foram estratificados por formulação de vacina de componente *pertussis*. Os recebedores de $CP_{20/20/5/3}DT$ (HYBRID) apresentaram níveis de anti-PRP inferiores quando a vacina foi administrada em combinação relativamente a administração separada. Estas diferenças não foram observadas nos recebedores de $CP_{10/5/5/3}DT$ e as diferenças desapareceram quando se combinaram os grupos. Todos os participantes atingiram níveis anti-PRP ≥0,15 μg/ml e mais de 98% de cada grupo apresentou um nível ≥1,0 μg/ml. Apenas quatro participantes (0,7%) do estudo não atingiram este nível; três nas injecções separadas em dias separados e um no

grupo de injecção combinada. Mais de 82% de cada grupo excedeu títulos de 10 μg/ml de anticorpo anti-PRP.

Das reacções locais desencadeadas, apenas a sensibilidade foi relatada mais frequentemente no grupo combinado (27,8%) comparativamente com o grupo de vacinação em dias separados (16,7%). Esta taxa não foi diferente da observada no grupo ao qual foram administradas vacinas no mesmo dia como injecções separadas (24,2%).

De um modo geral, relatou-se uma reacção sistémica com frequência semelhante (60 a 62,1%) nos participantes de cada um dos grupos de vacinação. Foi relatada febre em aproximadamente um terço dos participantes. Apenas foi relatada agitação nervosa mais habitualmente no grupo de injecção combinada (33,3%) comparativamente com os grupos de injecção separada (22,0%) ou de dias separados (22,8%).

Para resumir os resultados deste ensaio, a administração concomitante de $CP_{10/5/5/3}$DT ou $CP_{20/20/5/3}$DT e PRP-T no mesmo dia não interferiu com respostas anti-PRP mas pode realmente tê-las aumentado. As respostas serológicas a outros antigénios foram também excelentes. O tétano foi o único antigénio afectado quando se misturaram as duas vacinas mas todas as crianças apresentaram níveis de protecção elevados.

Para estes últimos ensaios clínicos prepararam-se $CP_{10/5/5/3}$DT-IPV cultivado em células MRC5 para reconstituição com ActHib (PRP-T) e A5I ($CP_{10/5/5/3}$DT-PRP-T-IPV cultivado em células Vero a 3 μg/ml). Adsorveram-se antigénios de componente *pertussis* individualmente a fosfato de alumínio a 3 mg/ml na ausência de conservante. Neste contexto, PT estava em fosfato de potássio 10 mM, NaCl 0,15 M, glicerol a 5%, FHA estava em fosfato de potássio 10 mM, NaCl 0,5 M, 69K estava em fosfato de potássio 10 mM, NaCl 0,15 M e a fímbria estava em fosfato de potássio 10 mM, NaCl 0,15 M. Adsorveu-se D a fosfato de alumínio (6,25 mg/ml) a uma concentração de 300 Lf/ml. Adicionou-se 2-fenoxietanol como conservante a 0,6%. Adsorveu-se T a fosfato de alumínio (6,25 mg/ml) a uma concentração de 300 Lf/ml. Adicionou-se 2-fenoxietanol a 0,6%.

Combinaram-se os antigénios de componente *pertussis* adsorvidos com D adsorvido e T adsorvido a uma concentração de 3,65 doses/ml ou 55% do volume final. O teor em 2-fenoxietanol foi 0,6%. Antes da combinação com mIPV ou v-IPV/PRP-T, confirmaram-se a esterilidade, o teor em alumínio e o teor em 2-fenoxietanol. Para 5 ml, adicionaram-se m-IPV e 2-fenoxietanol e diluiu-se até à potência final. Para A5I, adicionaram-se v-IPV, PRP-T e 2-fenoxietanol e diluiu-se até à potência final.

Resumindo os resultados dos ensaios clínicos com vacinas multivalentes, pode observar-se que $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produz respostas serológicas comparáveis a difteria, tétano e polios 1, 2 e 3 comparativamente com PENTA™ (contendo vacina de *pertussis* de células completas). As respostas anti-PRP são comparáveis ou superiores às observadas com PENTA™ tanto na dose para bebé como na dose de reforço. As respostas ao tétano são inferiores a $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T comparativamente com $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV administrado separadamente de PRP-T, mas esta redução não é clinicamente relevante. Consistentemente com outros estudos, a vacina com células completas produz respostas de fímbrias e aglutininas comparáveis ou superiores à vacina de componente *pertussis*; sabe-se contudo que a vacina de células completas utilizada contém uma componente fimbrial altamente imunogénica. Todas as outras respostas *pertussis* foram consistentemente superiores com $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T do que com PENTA™. Assim, o presente invento proporciona composições imunogénicas multivalentes nas quais as respostas imunes aos antigénios não são diminuídas ou prejudicadas pelas outras componentes ou pela sua inclusão na vacina multivalente. As respostas imunes diminuídas são algumas vezes referidas como interferência.

Preparação e utilização de vacina

Assim, podem preparar-se composições imunogénicas adequadas para serem utilizadas como vacinas a partir de imunogénios tal como aqui revelado. A vacina desencadeia uma resposta imune num indivíduo que produz anticorpos.

As composições imunogénicas incluindo vacinas podem ser preparadas como injectáveis, como soluções líquidas ou como emulsões. Os imunogénios podem ser misturados com excipientes farmaceuticamente aceitáveis que são compatíveis com os imunogénios. Tais excipientes podem incluir água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol e suas combinações. As composições imunogénicas e vacinas podem conter adicionalmente substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tampão de pH ou adjuvantes para aumentar a sua eficácia. As composições imunogénicas e vacinas podem ser administradas por via parentérica, por injecção subcutânea ou intramuscular. As preparações imunogénicas e vacinas são administradas de um modo compatível com a formulação de dosagem e numa quantidade tal que seja terapeuticamente eficaz, imunogénica e protectora.

A quantidade a ser administrada depende do indivíduo a ser tratado incluindo, por exemplo, a capacidade do sistema imune do indivíduo sintetizar anticorpos e se necessário, produzir uma resposta imune mediada por células. As quantidades exactas de ingrediente activo necessárias para administração dependem da opinião do médico. Contudo, o perito na arte pode determinar facilmente gamas de dosagem adequada e pode ser da ordem de microgramas de imunogénios. Os regimes adequados para as doses de administração inicial e de reforço são também variáveis, mas podem incluir uma administração inicial seguida de administrações subsequentes. A dosagem pode também depender da via de administração e variará de acordo com o tamanho do hospedeiro.

A concentração dos imunogénios numa composição imunogénica de acordo com o invento é geralmente cerca de 1 a cerca de 95%. A imunogenicidade pode ser significativamente melhorada se os antigénios forem co-administrados com adjuvantes, habitualmente utilizados como uma solução de 0,005 a 0,5 porcento em solução salina tamponada de fosfato. Os adjuvantes aumentam a imunogenicidade de um antigénio mas não são necessariamente eles próprios imunogénicos. Os adjuvantes podem actuar pela retenção do antigénio localmente perto do local de administração para produzir um efeito depósito que facilita uma libertação lenta e continuada de antigénio para células do sistema imune. Os adjuvantes podem também atrair

células do sistema imune para um depósito de antigénio e estimular essas células para desencadear respostas imunes.

Há muitos anos que são utilizados agentes ou adjuvantes imunoestimulantes para melhorar as respostas imunes do hospedeiro a, por exemplo, vacinas. Os adjuvantes intrínsecos, tais como lipopolissacáridos, são normalmente as componentes das bactérias mortas ou atenuadas utilizadas como vacinas. Os adjuvantes extrínsecos são imunomoduladores que se encontram tipicamente ligados de modo não covalente a antigénios e são formulados para aumentar as respostas imunes do hospedeiro. Assim, têm sido identificados adjuvantes que aumentam a resposta imune a antigénios administrados parentericamente. Alguns destes adjuvantes são tóxicos, contudo e podem causar efeitos secundários indesejáveis tornando-os indesejáveis para utilização em humanos e muitos animais. De facto, apenas se utilizam rotineiramente hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio (referidos colectivamente habitualmente como alúmen) como adjuvantes em vacinas humanas e veterinárias. A eficácia do alúmen no aumento das respostas de anticorpos contra os toxóides de difteria e de tétano está bem estabelecida.

Uma vasta gama de adjuvantes extrínsecos pode causar respostas imunes potentes a antigénios. Estes incluem saponinas complexadas a antigénios de proteína de membrana (complexos imunoestimulantes), polímeros plurónicos com óleo mineral, micobactérias mortas em óleo mineral, adjuvante completo de Freund, produtos bacterianos, tais como dipéptido de muramilo (MDP) e lipopolissacárido (LPS), assim como lípido A e lipossomas.

Para induzir eficazmente respostas imunes humorais (HIR) e imunidade mediada por células (CMI), os imunogénios são muitas vezes emulsionados em adjuvantes. Muitos adjuvantes são tóxicos, induzindo granulomas, inflamações agudas e crónicas (adjuvante completo de Freund, FCA), citólise (saponinas e polímeros plurónicos) e pirogenicidade, artrite e uveíte anterior (LPS e MDP). Apesar do FCA ser um excelente adjuvante e largamente utilizado em investigação, não está licenciado para utilização em vacinas humanas ou veterinárias devido à sua toxicidade.

As características pretendidas de adjuvantes ideais incluem:
(1) ausência de toxicidade;
(2) capacidade para estimular uma resposta imune duradoura;
(3) simplicidade de fabrico e estabilidade ao armazenamento a longo prazo;
(4) capacidade para desencadear tanto CMI como HIR contra antigénios administrados por diferentes vias;
(5) sinergia com outros adjuvantes;
(6) capacidade de interagir selectivamente com populações de células apresentadoras de antigénios (APC):
(7) capacidade para desencadear especificamente respostas imunes específicas de célula T_H1 ou T_H2 apropriadas; e
(8) capacidade para aumentar selectivamente níveis de isotipo de anticorpo adequados (por exemplo, IgA) contra antigénios.

A patente U.S. nº 4 855 283 concedida a Lockhoff et al a 8 de Agosto de 1989 que é aqui incorporada por referência a esta, apresenta análogos de glicolípidos incluindo N-glicosilamidas, N-glicosilureias e N-glicosilcarbamatos, sendo cada um substituído no resíduo de açúcar com um aminoácido, como imunomoduladores ou adjuvantes. Assim, Lockhoff et al. (patente U.S. nº 4 855 283 e ref. 60) relataram que análogos de N-glicolípido apresentando semelhanças estruturais com glicolípidos de ocorrência natural, tais como glicoesfingolípidos e glicoglicerolípidos, são capazes de desencadear respostas imunes fortes tanto em vacina vírus de herpes simplex como em vacina vírus de pseudo-raiva. Foram sintetizados alguns glicolípidos a partir de alquilaminas de cadeia longa e ácidos gordos que estão ligados directamente aos açúcares através do átomo de carbono anomérico, para mimetizar as funções dos resíduos de lípido de ocorrência natural.

A patente U.S. nº 4 258 029 concedida a Moloney, cedida a este cessionário e aqui incorporada como sua referência, refere que o cloridrato de octadeciltirosina (OTH) funciona como um adjuvante quando complexado com toxóide de tétano e vacina de poliovirusmielite tipo I, II e III inactivados por formalina. De igual modo, Nixon-George et al. (ref. 61), relataram que ésteres octodecílicos de aminoácidos aromáticos complexados com um antigénio de superfície de hepatite B

recombinante, aumentaram as respostas imunes do hospedeiro contra vírus da hepatite B.

EXEMPLOS

A revelação supra descreve de um modo geral o presente invento. Pode obter-se uma compreensão mais completa por referência aos seguintes exemplos específicos. Estes exemplos são descritos apenas a título ilustrativo e não pretendem limitar o âmbito do invento. As alterações de forma e substituição de equivalentes encontram-se abrangidas tal como pode ser sugerido pelas circunstâncias ou para tornar vantajoso. Apesar de terem sido aqui utilizadas expressões específicas, tais expressões devem ser encaradas num sentido descritivo e não com propósitos limitativos.

Os métodos de bioquímica de proteínas, fermentação e imunologia utilizados mas não descritos explicitamente nesta revelação e nestes exemplos encontram-se amplamente relatados na literatura científica e encontram-se abrangidos pelas capacidades dos peritos na arte.

Exemplo 1:

Este exemplo descreve o crescimento de *Bordetella pertussis*.

Inóculo principal:

As culturas de inóculo padrão de uma estirpe de *Bordetella pertussis* foram mantidas como lotes de inóculo liofilizados, entre 2°C e 8°C.

Inóculo activo:

A cultura liofilizada foi recuperada em meio Hornibrook e utilizada para inocular placas de ágar-ágar Bordet-Gengou (BGA). O meio Hornibrook tem a seguinte composição:

Componente	para 1 litro
Hidrolisado de caseína (tratado com carvão)	10,0 g
Ácido nicotínico	0,001 g
Cloreto de cálcio	0,002 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado	0,025 g
Cloreto de potássio	0,200 g
Fosfato de potássio dibásico	0,250 g
Amido	1,0 g
Água destilada para 1,0 litro	

Ajusta-se o pH a 6,9 ± 0,1 com solução de carbonato de sódio a 1%. Coloca-se o meio em tubos e esteriliza-se por vapor no autoclave durante 20 minutos e autoclavagem durante 20 minutos entre 121°C e 124°C. O inóculo foi sub-cultivado duas vezes, primeiramente em placas BGA e seguidamente em ágar-ágar de componente *pertussis* (CPA). O ágar-ágar de componente *pertussis* (CPA) tem a seguinte composição:

NaCl	2,5 g/L
KH_2PO_4	0,5 g/L
KCl	0,2 g/L
$MgCl_2(H_2O)_6$	0,1 g/L
Tris base	1,5 g/L
Casaminoácidos	10,0 g/L
NaHGlutamato	10,0 g/L
HCl concentrado	até pH 7,2
Ágar-ágar	15,0 g/L
Factores de crescimento (CPGF)	10,0 mL/L

Factores de crescimento de componente *pertussis* (CPGF) - 100 X tem a seguinte composição:

L-cisteína HCl	4,0 g/L
Niacina	0,4 g/L
Ácido ascórbico	40,0 g/L
Glutationa, reduzida	15,0 g/L
$Fe_2SO_4,(H_2O)_7$	1,0 g/L
Dimetil-β-ciclodextrina	100 g/L
$CaCl_2(H_2O)_2$	2,0 g/L

Suspendeu-se a cultura final em tampão de suspensão de inóculo de *pertussis* (CPSB), colocada em alíquotas de 2 a 4 ml e armazenada congelada de -60°C a -85°C. O tampão de suspensão de inóculo de *pertussis* (PSSB) tem a seguinte composição:

Casaminoácidos	10,0 g/L
Tris base	1,5 g/L
Glicerol anidro	100 mL/L
HCl concentrado	até pH 7,2

Estas suspensões de glicerol proporcionaram o material de partida para a preparação do inóculo activo.

Processo de cultura:

A propagação do inóculo activo foi efectuada em frascos de Roux de ágar-ágar de componente *pertussis* durante 4 a 7 dias de 34°C e 38°C. Após esta cultura, removeram-se as células do ágar-ágar por lavagem com meio de componente *pertussis* (CPB). As amostras foram observadas por coloração de Gram, relativamente a pureza e opacidade da cultura.

Transferiram-se as células para matrazes de 4 litros contendo CPB e incubaram-se de 34°C a 38°C durante 20 a 26 horas com agitação. Observaram-se as amostras por coloração de Gram e verificou-se a pureza da cultura. Juntou-se o conteúdo dos balões e utilizou-se a suspensão para inocular dois fermentadores contendo CPB (volume de 10 litros com início a DO_{600} 0,1-0,4). Cultivou-se o inóculo até uma OD_{600} final entre 5,0 e 10,0. Ensaiaram-se as amostras por coloração de Gram, relativamente à pureza da cultura, por ELISA com antigénios específicos e relativamente à esterilidade.

Exemplo 2:

Este exemplo descreve a purificação de antigénios a partir de cultura celular de *Bordetella pertussis*.

Produção de concentrados de meio e celulares:

Cultivou-se suspensão bacteriana em dois fermentadores de produção de 34°C a 37°C durante 35 a 50 horas. Amostraram-se os fermentadores para ensaio de esterilidade do meio.

Alimentou-se a suspensão a uma centrífuga de discos empilhados de fluxo contínuo (12 000 x g) para separar as células do meio. Recolheram-se as células antes da extracção da componente fimbrial. Passou-se o líquido clarificado através de um filtro de membrana < 0,22 μm. Concentrou-se o líquido filtrado por ultrafiltração utilizando uma membrana com 10 a 30 kDa de limite de peso molecular nominal (NMWL). Armazenou-se o concentrado antes da separação e purificação das componentes de toxina de *pertussis* (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) e 69 kDa (pertactina).

Separação das componentes do meio

Separaram-se as componentes do meio (69 kDa, PT e FHA) e purificaram-se por cromatografia perlite e passos de eluição selectiva, essencialmente tal como descrito na patente EP nº 336 736 e no pedido PCT nº WO 91/15505 publicado pelos requerentes, descrito supra. Descrevem-se infra as operações de purificação específicas efectuadas.

Toxina de *pertussis* (PT):

Lavou-se a coluna de perlite com tampões Tris 50 mM, Tris 50 mM/Triton X-100 a 0,5% e Tris 50 mM. Eluíu-se a fracção PT da coluna de perlite com tampão Tris 50 mM/NaCl 0,12 M.

Carregou-se a fracção PT da cromatografia de perlite numa coluna de hidroxilapatite e seguidamente lavou-se com tampão fosfato de potássio 30 mM. Eluiu-se PT com tampão fosfato de potássio 75 mM /NaCl 225 mM. Lavou-se a coluna com fosfato de potássio 200 mM /NaCl 0,6 M para obter a fracção FHA que foi rejeitada. Adicionou-se glicerol à PT purificada a 50% e armazenou-se a mistura de 2°C a 8°C até desintoxicação no prazo de uma semana.

Hemaglutinina filamentosa (FHA):

Eluíu-se a fracção FHA da coluna de perlite com Tris 50 mM /NaCl 0,6 M. Purificou-se a hemaglutinina filamentosa por cromatografia em hidroxilapatite. A fracção FHA da coluna de perlite foi carregada numa coluna de hidroxilapatite e seguidamente lavada com fosfato de potássio 30 mM contendo Triton X-100 a 0,5%, seguido de tampão de fosfato de potássio 30 mM. Eluíu-se a fracção PT com tampão fosfato de potássio 85 mM e rejeitou-se. Eluiu-se então a fracção FHA com fosfato de

potássio 200 mM /NaCl 0,6 M e armazenou-se de 2°C a 8°C até desintoxicação no prazo de uma semana.

69 kDa (pertactina)

Diluiu-se o concentrado de meio com água para injecção (WFI) para obter uma condutividade de 3 a 4 mS/cm e carregou-se numa coluna de perlite com uma carga de 0,5 a 3,5 mg de proteína por ml de perlite. Concentrou-se o eluído (fracção de componente 69 kDa) por ultrafiltração por utilização de uma membrana NMWL de 10 a 30 kDa. Adicionou-se sulfato de amónio ao concentrado eluído para 35% ± 3% (p/v) e armazenou-se a mistura resultante de 2°C a 8°C durante 4 a 2 dias ou centrifugou-se (7 000 x g) imediatamente. Decantou-se o excesso de sobrenadante e recolheu-se o precipitado por centrifugação (7 000 x g). O sedimento de 69 kDa foi quer armazenado congelado de -20°C a -30°C, quer dissolvido em tampão Tris ou fosfato e utilizado imediatamente.

Utilizou-se para a purificação a proteína de membrana externa de 69 kDa obtida da precipitação com sulfato de amónio a 35% (p/v) do eluído de perlite concentrado. Adicionou-se sulfato de amónio (100 ± 5 g por litro) à fracção de 69 kDa e agitou-se a mistura durante pelo menos 2 horas de 2°C a 8°C. Centrifugou-se a mistura (7 000 x g) para recuperar o sobrenadante. Adicionou-se sulfato de amónio (100 a 150 g por litro) ao sobrenadante e agitou-se a mistura durante pelo menos 2 horas de 2°C a 8°C. Centrifugou-se a mistura (7 000 x g) para recuperar o sedimento, que foi dissolvido em Tris HCl 10 mM, pH 8. Ajustou-se a força iónica da solução para ser equivalente a Tris HCl 10 mM (pH 8) contendo sulfato de amónio 15 mM.

Aplicou-se a proteína 69 kDa a uma coluna de hidroxilapatite ligada em tandem com uma coluna Q-Sepharose. Recolheu-se a proteína 69 kDa no eluído, passou-se Tris HCl 10 mM (pH 8) contendo sulfato de amónio 15 mM pelas colunas e juntou-se com proteína 69 kDa do eluído. O conjunto de proteína 69 kDa foi diafiltrado com 6 a 10 volumes de fosfato de potássio 10 mM (pH 8) contendo NaCl 0,15 M numa membrana NMWL de 100 a 300 kDa. Recolheu-se o ultrafiltrado e a proteína 69 kDa do ultrafiltrado foi concentrada.

Permutou-se o solvente da proteína 69 kDa para Tris HCl 10 mM (pH 8) e adsorveu-se em Q-Sepharose, lavou-se com Tris HCl 10 mM (pH 8)/sulfato de amónio 5 mM. Eluíu-se a proteína 69 kDa com fosfato de potássio 50 mM (pH 8). A proteína 69 kDa foi diafiltrada com 6 a 10 volumes de fosfato de potássio 10 mM (pH 8) contendo NaCl 0,15 M numa membrana NMWL de 10 a 30 kDa. A proteína 69 kDa foi esterilizada por filtração através de um filtro < 0,22 μm. Armazenou-se este conjunto estéril de 2°C a 8°C e efectuou-se adsorção no prazo de três meses.

Aglutinogénios fimbriais:

Purificaram-se os aglutinogénios a partir da pasta celular após separação do meio. Diluiu-se a pasta celular para uma fracção de volume de células de 0,05 num tampão contendo fosfato de potássio 10 mM, NaCl 150 mM e ureia 4 M e agitou-se durante 30 minutos. Clarificou-se o lisado celular por centrifugação (12 000 x g) e seguidamente concentrou-se e diafiltrou-se contra fosfato de potássio 10 mM/NaCl 150 mM/Triton X-100 a 0,1% utilizando um filtro de membrana NMWL de 100 a 300 kDa.

O concentrado foi tratado com calor a 80°C durante 30 min e seguidamente reclarificado por centrifugação (9 000 x g). Adicionou-se PEG 8000 ao sobrenadante clarificado para uma concentração final de 4,5% ± 0,2% e agitou-se suavemente durante um mínimo de 30 minutos. O precipitado resultante foi recolhido por centrifugação (17 000 x g) e o sedimento foi extraído com tampão fosfato de potássio 10 mM/NaCl 150 mM para proporcionar uma solução de aglutinogénio fimbrial em bruto. Purificaram-se os aglutinogénios fimbriais por passagem sobre sílica PEI. Tornou-se a solução bruta 100 mM relativamente a fosfato de potássio por utilização de tampão de fosfato de potássio 1 M e passou-se através da coluna de sílica PEI.

Os eluatos das colunas foram concentrados e diafiltrados contra tampão fosfato de potássio 10 mM/NaCl 150 mM utilizando um filtro de membrana NMWL de 100 a 300 kDa. Armazena-se este conjunto estéril de 2°C a 8°C e efectua-se adsorção no prazo de três meses. A preparação de aglutinogénio fimbrial continha Agg 2 fimbrial e Agg 3 fimbrial numa razão de peso entre cerca

de 1,5 e cerca de 2:1 e revelou ser substancialmente isenta de Agg 1.

Exemplo 3:

Este exemplo descreve a desintoxicação química dos antigénios de *Bordetella pertussis* purificados, PT e FHA.

PT, preparado na forma pura como descrito no exemplo 2, foi submetido a desintoxicação química por ajuste da concentração de glutaraldeído na solução PT para 0,5% ± 0,1% e incubação a 37°C ± 3°C durante 4 horas. Parou-se a reacção por adição de L-aspartato para 0,21 ± 0,02 M. Manteve-se então a mistura à temperatura ambiente durante 1 ± 0,1 horas e seguidamente de 2°C a 8°C durante 1 a 7 dias.

A mistura resultante foi diafiltrada contra tampão fosfato de potássio 10 mM/NaCl 0,15 M/glicerol a 5% num filtro de membrana NMWL de 30 kDa e seguidamente esterilizada por passagem através de um filtro de membrana <0,22 μm. Este conjunto estéril foi armazenado de 2°C a 8°C e efectuou-se adsorção no prazo de três meses.

A fracção FHA, preparada na forma pura tal como descrito no exemplo 2, foi submetida a desintoxicação química por ajuste da concentração de L-lisina e formaldeído a 47 ± 5 mM e 0,24 ± 0,05% respectivamente e incubação de 35°C a 38°C durante 6 semanas. A mistura foi então diafiltrada contra fosfato de potássio 10 mM/NaCl 0,5 M utilizando um filtro de membrana NMWL de 30 kDa e esterilizada por passagem através de um filtro de membrana. Armazenou-se este conjunto estéril de 2°C a 8°C e efectuou-se adsorção no prazo de três meses.

Exemplo 4:

Este exemplo descreve a adsorção dos antigénios de *Bordetella pertussis* purificados.

Para a adsorção individual de PT, FHA, Agg e 69 kDa em fosfato de alumínio (alúmen), preparou-se uma solução-mãe de fosfato de alumínio a uma concentração de 18,75 ± 1 mg/ml. Preparou-se um recipiente adequado e qualquer um dos

antigénios foi adicionado assepticamente ao recipiente. Adicionou-se assepticamente 2-fenoxietanol para proporcionar uma concentração final de 0,6% ± 0,1% v/v e agitou-se à homogeneidade. Adicionou-se assepticamente o volume adequado de fosfato de alumínio ao recipiente. Adicionou-se um volume adequado de água destilada estéril para tornar a concentração final 3 mg de fosfato de alumínio/ml. Selaram-se e rotularam-se os recipientes e deixaram-se em agitação à temperatura ambiente durante 4 dias. O recipiente foi então armazenado até formulação final.

Exemplo 5:

Este exemplo descreve a formulação de uma vacina de componente *pertussis* combinada com toxóides de difteria e tétano.

Os antigénios de *B. pertussis* preparados tal como descrito nos exemplos precedentes foram formulados com toxóides de difteria e tétano para proporcionar várias vacinas de componente *pertussis* (CP) tal como descrito infra.

As componentes *pertussis* foram produzidas a partir de *Bordetella pertussis* cultivada em culturas submersas tal como descrito detalhadamente nos exemplos 1 a 4 supra. Após crescimento completo, separaram-se o meio de cultura e as células bacterianas por centrifugação. Cada antigénio foi purificado individualmente. Purificaram-se toxina de *pertussis* (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) a partir do meio por cromatografia sequencial em perlite e hidroxilapatite. Desintoxicou-se PT com glutaraldeído e qualquer PT residual (aproximadamente 1%) presente na fracção FHA foi desintoxicado com formaldeído. Prepararam-se aglutinogénios fimbriais (2+3) (AGG) a partir das células bacterianas. Romperam-se as células com ureia e trataram-se com calor e purificaram-se os aglutinogénios fimbriais por precipitação com polietilenoglicol e cromatografia em polietilenoimina sílica. Isolou-se a componente de proteína 69 kDa (pertactina) do eluato da etapa de cromatografia em perlite (exemplo 2) por precipitação com sulfato de amónio e purificou-se por cromatografia sequencial em hidroxilapatite e Q-sepharose.

Esterilizaram-se todas as componentes por filtração através de um filtro de membrana de 0,22 μm.

Preparou-se toxóide de difteria a partir de *Corynebacterium diphtheriae* cultivada em meio submerso por métodos padrão. A produção de toxóide de difteria divide-se em cinco etapas, nomeadamente manutenção do inóculo activo, crescimento de *Corynebacterium diphtheriae*, recolha da toxina de difteria, desintoxicação da toxina de difteria e concentração do toxóide de difteria.

Preparação de toxóide de difteria

(I) Inóculo activo

A estirpe de *Corynebacterium diphtheriae* foi mantida como um lote de inóculo liofilizado. Cultivou-se o inóculo reconstituído em meio Loeffler slope durante 18 a 24 horas a 35°C ± 2°C e seguidamente transferiu-se para balões de meio de difteria. A cultura foi seguidamente ensaiada relativamente a pureza e teor Lf. O inóculo remanescente foi utilizado para inocular um fermentador.

(II) Cultura de *Corynebacterium diphtheriae*.

A cultura foi incubada a 35°C ± 2°C e agitada no fermentador. Adicionaram-se à cultura quantidades pré-determinadas de soluções de sulfato ferroso, cloreto de cálcio e fosfato. As quantidades reais de cada solução (fosfato, sulfato ferroso, cloreto de cálcio) foram determinadas experimentalmente para cada lote de meio. Os níveis escolhidos são aqueles que forneceram o teor mais elevado em Lf. No fim do ciclo de crescimento (30 a 50 horas), amostraram-se as culturas relativamente a pureza e teor Lf.

Ajustou-se o pH com bicarbonato de sódio e a cultura foi inactivada com tolueno a 0,4% durante 1 hora a uma temperatura mantida a 35°C ± 2°C. Efectuou-se então um ensaio de esterilidade para confirmar a ausência de *C. diphtheriae* viva.

(III) Recolha de toxina de difteria

Juntaram-se as culturas tratadas com tolueno de um ou vários fermentadores num tanque grande. Adicionou-se

aproximadamente, bicarbonato de sódio a 0,12%, carvão a 0,25% e sulfato de amónio a 23% e ensaiou-se o pH.

Agitou-se a mistura durante cerca de 30 minutos. Adicionou-se terra de diatomáceas e bombeou-se a mistura para um filtro de profundidade. Recirculou-se o filtrado até se apresentar límpido e seguidamente recolheu-se e amostrou-se para ensaio de teor Lf. Adicionou-se sulfato de amónio adicional ao filtrado para proporcionar uma concentração de 40%. Adicionou-se igualmente terra de diatomáceas. Esta mistura foi mantida durante 3 a 4 dias de 2°C a 8°C para permitir a sedimentação do precipitado. A toxina precipitada foi recolhida e dissolvida em solução salina a 0,9%. Removeu-se a terra de diatomáceas por filtração e dialisou-se a toxina contra solução salina a 0,9% para remover o sulfato de amónio. Juntou-se a toxina dialisada e amostrou-se para teor Lf e ensaio de pureza.

(IV) Desintoxicação de toxina de difteria

A desintoxicação ocorre imediatamente após a diálise. Para a desintoxicação, diluiu-se a toxina de modo a que a solução final contivesse:

a) toxina de difteria a 1000 ± 10% Lf/ml.
b) bicarbonato de sódio a 0,5%
c) formalina a 0,5%
d) monocloridrato de L-lisina a 0,9% p/v

Ajustou-se o volume da solução com solução salina e ajustou-se o pH a 7,6 ± 0,1.

Filtrou-se o toxóide através de cartuchos de filtração de celulose e terra de diatomáceas e/ou um pré-filtro de membrana e um filtro de membrana de 0,2 μm para o recipiente de recolha e incubou-se durante 5 a 7 semanas a 34°C. Recolheu-se uma amostra para ensaio de toxicidade.

(V) Concentração de toxóide purificado

Juntaram-se os toxóides e seguidamente concentraram-se por ultrafiltração e recolheram-se num recipiente adequado. Retiraram-se amostras para ensaios de teor Lf e pureza. Adicionou-se o conservante (2-fenoxietanol) para obter uma

concentração final de 0,375% e ajustou-se o pH entre 6,6 e 7,6.

Esterilizou-se o toxóide por filtração através de um pré-filtro e um filtro de membrana de 0,2 μm (ou equivalente) e recolheu-se. Amostrou-se então toxóide estéril relativamente a irreversibilidade de teor de Lf toxóide, teor de conservante, pureza (teor em azoto), esterilidade e ensaio de toxicidade. Armazenou-se o toxóide concentrado estéril de 2°C a 8°C até formulação final.

Preparação de toxóide de tétano

Preparou-se toxóide de tétano (T) a partir de *Clostridium tetani* cultivado em cultura submersa.

A produção de toxóide de tétano pode ser dividida em cinco etapas, nomeadamente manutenção do inóculo activo, cultura de *Clostridium tetani*, recolha da toxina de tétano, desintoxicação de toxina de tétano e purificação de toxóide de tétano.

(I) Inóculo activo

Manteve-se a estirpe de *Clostridium tetani* utilizada na produção de toxina de tétano para a conversão para toxóide de tétano em forma liofilizada num lote de inóculo. Inoculou-se o inóculo em meio de tioglicolato e deixou-se crescer durante aproximadamente 24 horas a 35°C ± 2°C. Retirou-se uma amostra para ensaiar a pureza da cultura.

(II) Cultura de *Clostridium tetani*

Colocou-se o meio de tétano num fermentador, tratou-se por calor e arrefeceu-se. Inoculou-se então o fermentador e deixou-se crescer a cultura durante 4 a 9 dias a 34°C ± 2°C. Retirou-se uma amostra para ensaio de pureza de cultura e de teor de Lf.

(III) Recolha de toxina de tétano

Separou-se a toxina por filtração através de cartuchos de celulose e terra de diatomáceas e seguidamente filtrou-se para esterilização a toxina clarificada utilizando filtros de membrana. Retiraram-se amostras para ensaio de teor de Lf e

esterilidade. Concentrou-se a toxina por ultrafiltração, utilizando um tamanho de poro de 30 000 dalton.

(IV) Desintoxicação de toxina de tétano

Amostrou-se a toxina para ensaio de teor de Lf antes de desintoxicação. Desintoxicou-se a toxina concentrada (475 a 525 Lf/ml) por adição de bicarbonato de sódio a 0,5% p/v, formalina a 0,3% v/v e monocloridrato de L-lisina a 0,9% p/v e completou-se o volume com solução salina. Ajustou-se o pH a 7,5 ± 0,1 e incubou-se a mistura a 37°C durante 20 a 30 dias. Retiraram-se amostras para ensaio de esterilidade e toxicidade.

(V) Purificação de toxóide

O toxóide concentrado foi esterilizado através de pré-filtros, seguido por filtros de membrana de 0,2 μm. Retiraram-se amostras para ensaio de esterilidade e teor de Lf.

A concentração óptima de sulfato de amónio baseou-se numa curva de fraccionamento "S" determinada a partir de amostras do toxóide. Adicionou-se a primeira concentração ao toxóide (diluído a 1900-2100 Lf/ml). Manteve-se a mistura durante pelo menos 1 hora de 20°C a 25°C e recolheu-se o sobrenadante e rejeitou-se o precipitado contendo a fracção de alto peso molecular.

Adicionou-se uma segunda concentração de sulfato de amónio ao sobrenadante para o segundo fraccionamento para remover as impurezas de baixo peso molecular. Manteve-se a mistura durante pelo menos 2 horas de 20°C a 25°C e seguidamente poderia ser mantida de 2°C a 8°C durante um máximo de três dias. Recolheu-se o precipitado, que representa o toxóide purificado, por centrifugação e filtração.

Removeu-se o sulfato de amónio do toxóide purificado por diafiltração, utilizando membranas de ultrafiltração Amicon (ou equivalentes) com PBS até não se detectar mais sulfato de amónio na solução de toxóide. Ajustou-se o pH de 6,6 a 7,6 e adicionou-se 2-fenoxietanol para obter uma concentração final de 0,375%. Esterilizou-se o toxóide por filtração em membrana e obtiveram-se amostras para ensaio (irreversibilidade de

toxóide, teor de Lf, pH, teor de conservante, pureza, esterilidade e toxicidade).

Formulação de vacina multivalente

Uma formulação de uma vacina de componente *pertussis* combinada com toxóides de difteria e tétano foi denominada $CP_{10/5/5/3}DT$ (por vezes denominada CLASSIC). Cada dose humana de 0,5 ml de $CP_{10/5/5/3}DT$ foi formulada para conter:

10 μg de toxóide de *pertussis* (PT)
5 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 μg de aglutinogénios fimbriais 2 e 3 (FIMB)
3 μg de proteína de membrana externa de 69 kDa

15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano

1,5 mg de fosfato de alumínio

2-fenoxietanol a 0,6% como conservante

Outra formulação de vacina de componente *pertussis* combinada com toxóides de difteria e tétano foi denominada $CP_{10/5/5}DT$ (por vezes denominada HYBRID). Cada dose humana de 0,5 ml de $CP_{10/5/5}DT$ foi formulada para conter:

10 μg de toxóide de *pertussis* (PT)
5 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 μg de aglutinogénios fimbriais 2 e 3 (FIMB)

15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano

1,5 mg de fosfato de alumínio

2-fenoxietanol a 0,6% como conservante

Outra formulação de vacina de componente *pertussis* combinada com toxóides de difteria e tétano foi denominada

$CP_{20/20/5/3}DT$. Cada dose humana de 0,5 ml de $CP_{20/20/5/3}DT$ foi formulada para conter:

20 μg de toxóide de *pertussis* (PT)
20 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 μg de aglutinogénios fimbriais 2 e 3 (FIMB)
3 μg de proteína de membrana externa de 69 kDa

15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano

1,5 mg de fosfato de alumínio

2-fenoxietanol a 0,6% como conservante

Uma formulação adicional de uma vacina de componente *pertussis* combinada com toxóides de difteria e tétano foi denominada $CP_{20/10/10/6}DT$. Cada dose humana de 0,5 ml de $CP_{20/10/10/6}DT$ foi formulada para conter:

20 μg de toxóide de *pertussis* (PT)
10 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
10 μg de aglutinogénios fimbriais 2 e 3 (FIMB)
6 μg de proteína de membrana externa de 69 kDa

15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano

1,5 mg de fosfato de alumínio

2-fenoxietanol a 0,6% como conservante

Exemplo 6:

Este exemplo descreve a avaliação clínica de vacinas de componente *pertussis* acelular.

(a) Estudos em adultos

Estudos em adultos e crianças de 16 a 20 meses de idade indicaram que as vacinas multicomponentes contendo

aglutinogénios fimbriais são seguras e imunogénicas (Tabela 2).

Efectuou-se um estudo clínico de fase I em crianças de 17 e 18 meses de idade em Calgary, Alberta com a vacina de *pertussis* de cinco componentes ($CP_{10/5/5/3}DT$) e relataram-se as reacções adversas. Trinta e três crianças receberam as vacinas e adicionalmente 35 receberam a mesma vacina sem a componente de proteína de 69 kDa.

As reacções locais foram raras. As reacções adversas sistémicas, que consistiram principalmente de irritabilidade, estiveram presentes em aproximadamente metade dos participantes do estudo, independentemente da vacina que foi administrada. Mediram-se aumentos significativos de anticorpos para anticorpos IgG anti-PT, anti-FHA, anti-aglutinogénios fimbriais e anti-69kDa por imunoensaio enzimático e anticorpos anti-PT no ensaio de neutralização de células CHO. Não se detectaram quaisquer diferenças na resposta de anticorpos em crianças que receberam os quatro componentes ($CP_{10/5/5}DT$) ou cinco componentes ($CP_{10/5/5/3}DT$) excepto no anticorpo anti-69kDa. As crianças que receberam a vacina de cinco componentes contendo a proteína de 69 kDa apresentavam um nível pós-imunização de anticorpo anti-69 kDa significativamente superior.

Efectuou-se um estudo de dose-resposta com a vacina de 4 componentes em Winnipeg, Manitoba, Canadá. Utilizaram-se duas formulações de vacinas de componentes: $CP_{10/5/5/3}DT$ e $CP_{20/10/10/6}DT$. Incluiu-se também uma vacina DPT de células completas como um controlo.

Este estudo foi um estudo duplamente cego em 91 bebés de 17 a 18 meses de idade na altura da sua dose de reforço de *pertussis*. Tanto $CP_{10,5,5,3}DT$ como $CP_{20,10,10,6}DT$ foram bem toleradas por estas crianças. Não se demonstraram quaisquer diferenças no número de crianças que tinham qualquer reacção local ou reacções sistémicas após qualquer uma das vacinas de componentes. Contrariamente, significativamente mais crianças que receberam a vacina de células completas apresentaram reacções locais e sistémicas do que as que receberam as vacinas de componentes $CP_{20,10,10,6}DT$.

Estudos em bebés:

Fase II:

Efectuou-se um estudo utilizando a vacina $CP_{10,5,5,3}DT$ em Calgary, Alberta e British Columbia, Canadá. Neste estudo, 432 bebés receberam a vacina de componente *pertussis* ou a vacina de controlo de células completas DPT aos 2, 4 e 6 meses de idade. A vacina $CP_{10,5,5,3}DT$ foi bem tolerada por estes bebés. As reacções locais foram menos comuns com a vacina de componente do que com a vacina de células completas após cada dose.

Demonstrou-se uma resposta de anticorpos significativa a todos os antigénios após vacina com a vacina de componente *pertussis*. Os recebedores da vacina de células completas apresentaram uma resposta de anticorpos vigorosa aos aglutinogénios fimbriais, D e T. Aos sete meses, 82% a 89% dos recebedores da vacina de componentes e 92% dos recebedores da vacina de células completas apresentaram um aumento de quatro vezes ou superior no título de anticorpo contra aglutinogénios fimbriais. Contrariamente, a resposta de anticorpo a FHA foi de 75% a 78% nos recebedores de vacinas de componente comparativamente a 31% para recebedores de células completas. Verificou-se um aumento de quatro vezes no anticorpo anti-69 kDa em 90% a 93% dos recebedores de vacinas de componente e 75% de recebedores de células completas. Verificou-se um aumento de quatro vezes no anticorpo contra PT por imunoensaio enzimático em 40% a 49% de vacinas de componente e 32% de vacinas de células completas; verificou-se um aumento de quatro vezes no anticorpo contra PT por neutralização CHO em 55% a 69% das vacinas de componente e 6% de vacinas de células completas. (Tabela 2).

Fase IIB:

As vacinas $CP_{20/20/5/3}DT$ e $CP_{10/10/5/3}DT$ foram avaliadas num estudo cego randomizado contra um controlo $D_{15}PT$ com um teor de difteria inferior a 15 Lf comparativamente a uma formulação de 25 Lf em 100 bebés de 2, 4 e 6 meses de idade. Não se verificaram quaisquer diferenças nas taxas de reacções secundárias entre as duas formulações de componente; ambas foram significativamente menos reactogénicas do que o controlo de células completas. Atingiram-se títulos de anticorpo contra PT superiores por imunoensaio enzimático e neutralização CHO e

FHA em recebedores da vacina $CP_{20/20/5/3}DT$ com teor de antigénio aumentado. Aos 7 meses, a média geométrica de título de anti-FHA foi de 95,0 em recebedores de $CP_{20/20/5/3}DT$, 45,2 em recebedores de $CP_{10/5/5/3}DT$ e foi somente 8,9 em recebedores de $D_{15}PT$. Os títulos anti-PT foram de 133,3, 58,4 e 10,4 por imunoensaio e 82,4, 32,7 e 4,0 por neutralização CHO, respectivamente (Tabela 2).

Este estudo demonstrou que a vacina de componente *pertussis* combinada com toxóides de difteria e tétano adsorvidos, com teor de antigénio aumentado, foi segura e imunogénica em bebés e que o teor de antigénio aumentado aumentou a resposta imune aos antigénios preparados (PT e FHA) sem um aumento de reactogenicidade.

Estudo comparativo de fase II de NIAID, EUA:

Efectuou-se um estudo de fase II nos Estados Unidos da América com supervisão do "National Institute of Allergy e Infectious Diseases" (NIAID), como um prelúdio a um ensaio de eficácia em larga escala de vacinas de *pertussis* acelulares.

Incluiu-se nesse ensaio uma vacina de componente *pertussis* do invento em combinação com toxóides de difteria e tétano adsorvidos ($CP_{10/5/5/3}DT$) conjuntamente com outras 12 vacinas acelulares e 2 vacinas de células completas. Relataram-se os resultados de segurança em 137 crianças imunizadas aos 2, 4 e 6 meses de idade com a vacina de componentes $CP_{10/5/5/3}DT$.

Tal como verificado em estudos anteriores, verificou-se que a vacina de componente é segura, de baixa reactogenicidade e é bem tolerada por vacinas.

Aos 7 meses, anticorpo anti-PT, anticorpo anti-FHA, anticorpo anti-69kDa e anticorpo anti-aglutinogénios fimbriais foram todos superiores ou equivalentes aos níveis atingidos após vacinas de células completas (ref. 71 e tabela 2). Efectuou-se um estudo duplamente cego em que se distribuíram aleatoriamente crianças para receber quer a formulação de vacina $CP_{20/20/5/3}DT$, quer a formulação de vacina $CP_{10/5/5/3}DT$. Incluíram-se um total de 2050 bebés nos Estados Unidos da América e Canadá; 1961 bebés completaram o estudo. Ambas as

formulações de vacina foram seguras, de baixa reactogenicidade e imunogénicas nestes bebés. A imunogenicidade foi avaliada num subgrupo de 292. Desencadeou-se um aumento de anticorpos contra todos os antigénios contidos na vacina por ambas as formulações de vacina. A formulação $CP_{20/20/5/3}DT$ induziu títulos superiores de anticorpo contra FHA mas não contra PT. A formulação $CP_{10/5/5/3}DT$ desencadeou títulos elevados contra fímbrias e títulos de aglutinogénio superiores.

Efectuou-se um estudo de segurança e imunogenicidade adicional em França. O projecto do estudo foi semelhante ao do estudo nos Estados Unidos da América, descrito supra, com excepção das vacinas serem administradas aos 2, 3 e 4 meses de idade. As reacções locais e sistémicas foram em geral pequenas. Globalmente, a vacina foi bem aceite pelos participantes do estudo francês utilizando este regime de administração.

Ensaio de eficácia controlado com placebo de duas vacinas de *pertussis* acelulares e de uma vacina de células completas em 10 000 bebés

Após os resultados do ensaio comparativo de fase II de NIAID, EUA, seleccionou-se uma vacina acelular de dois componentes e uma vacina acelular de cinco componentes para um ensaio de eficácia multi-centro, controlado, duplamente randomizado e controlado com placebo. O ensaio clínico foi efectuado na Suécia, onde existe uma incidência elevada de *pertussis*. A vacina de dois componentes continha PT inactivado por gliceraldeído e formalina (25 μg), FHA tratado com formalina (25 μg) e 17 Lf de toxóide de difteria e 10 Lf de toxóide de tétano. A vacina de *pertussis* de cinco componentes foi $CP_{10/5/5/3}DT$. Para o ensaio, recrutaram-se dez mil bebés, representando aproximadamente metade dos bebés deste grupo etário na Suécia, em 14 locais de estudo definidos geograficamente pela utilização do registo de nascimento.

Randomizaram-se crianças nascidas em Janeiro e Fevereiro de 1992 num ensaio de 3 ramos. Após consentimento dos pais, dois terços dos bebés receberam uma das duas preparações de difteria-tétano-*pertussis* acelular aos dois, quatro e seis meses de idade. O grupo de controlo recebeu somente DT. Em

Maio de 1992, introduziu-se uma vacina DTP de células completas disponível comercialmente e licenciada nos EUA e randomizaram-se as crianças nascidas de Março a Dezembro de 1992 num estudo de 4 ramos. Após consentimento dos pais, três quartos dos bebés receberam uma das três preparações DTP aos dois, quatro e seis meses de idade. O grupo de controlo recebeu somente DT.

Cada vacina foi administrada a cerca de 2 500 crianças. As vacinas foram administradas em três doses. A primeira dose foi administrada aos 2 meses de idade e não depois dos 3 meses de idade. As doses subsequentes foram administradas com intervalos de 8 semanas. As vacinas foram administradas por injecção intramuscular.

As crianças e a sua família foram seguidas durante 30 meses. Nos casos em que surgiram suspeitas de *pertussis*, recolheram-se dados clínicos e efectuou-se verificação laboratorial de aspirados nasais para cultura bacteriológica e diagnóstico por reacção de polimerização em cadeia (PCR). Recolheram-se amostras de sangue na fase aguda e convalescente para diagnóstico serológico.

Antes deste estudo, a extensão de pertactina proporcionada pelas vacinas de componente *pertussis* do presente invento numa população humana em risco (nomeadamente neonatos) era desconhecida. Nomeadamente, não se conhecia a contribuição dos vários componentes de *Bordetella* e a sua presença em vacinas de *pertussis* em quantidades relativas seleccionadas para a eficácia das vacinas.

O principal objectivo do ensaio foi estimar a capacidade de vacinas de *pertussis* acelulares e da vacina de células completas para proteger contra a *pertussis* típica comparativamente a placebo.

Um objectivo secundário foi explorar a eficácia da vacina contra infecção de *pertussis* confirmada de gravidade variável.

A eficácia da vacina é definida como a percentagem de redução da probabilidade de contrair *pertussis* entre os recebedores da vacina relativamente a crianças não vacinadas.

O risco relativo de *pertussis* em dois grupos de vacina é expresso como a razão da probabilidade de doença nos dois grupos.

A probabilidade de contrair *pertussis*, também denominada taxa de ataque, pode ser estimada de várias formas. Nos cálculos de tamanho da amostra, a probabilidade de contrair *pertussis* num determinado grupo de estudo é estimada pelo quociente entre o número de crianças com *pertussis* e as crianças que permanecem no grupo de estudo no final do seguimento do estudo.

A eficácia da vacina de componente $CP_{10/5/5/3}DT$ neste ensaio na prevenção de *pertussis* típica apresenta-se na tabela 4 e foi cerca de 85%. No mesmo ensaio, uma vacina acelular de *pertussis* de dois componentes contendo apenas PT e FHA foi cerca de 58% eficaz e uma vacina de células completas foi cerca de 48% eficaz. A $CP_{10,5,5,3}DT$ foi também eficaz na prevenção de *pertussis* moderada com uma eficácia estimada de cerca de 77%.

Exemplo 7 (para comparação)

Este exemplo descreve a formulação e imunogenicidade da vacina de combinação multivalente contendo um polissacárido da cápside de *Haemophilus influenzae*.

(a) Preparação do componente PRP-T

Purificou-se o polissacárido da cápside (PRP) de *H. influenzae* e conjugou-se a toxóide de tétano da seguinte forma. Prepararam-se três pré-culturas sucessivas a partir de ampolas liofilizadas do lote de inóculo activo de *H. influenzae*. A primeira pré-cultura foi em meio sólido. Inocularam-se as ampolas para placas de ágar-ágar de carvão + sangue fervido (sangue de cavalo a 10% aquecido durante 15 min a 80°C) e incubaram-se durante 20 ± 4 horas de 36°C a 37°C sob CO_2. A segunda pré-cultura foi em meio líquido durante 8 horas a 37°C. O meio líquido tinha a seguinte composição por litro:

1. Casaminoácidos Difco 10 g
   Fosfato monossódico $2H_2O$ 2,03 g
   Fosfato dissódico $12H_2O$ 31,14 g
   Lactato de sódio (solução a 60%) 1,5 ml
   L-cistina 0,07 g
   L-triptofanos 0,02 g
   $CaCL_2$, $2H_2O$ 0,02 g
   $(NH4)_2SO_4$ 1 g
   $MgSO_4$, $7H_2O$ 0,4 g
   Anti-espuma Dow Corning M.S.A
   Em óleo de parafina a 25% 0,15 ml

2. Ultrafiltrado de hemina + dextrose na proporção de 20 g de dextrose e 1 mg de hemina. Esta solução é adicionada com 5 mg de nicotinamida-adenina dinucleótido, esterilizada por filtração.

3. Extracto de levedura Difco 5 g
   Esterilizado por filtração.

A terceira pré-cultura foi em meio líquido com agitação durante 4 horas a 37°C. A terceira pré-cultura foi utilizada para inocular o fermentador e a cultura foi mantida com agitação, a 37°C durante 12 a 14 horas. Recolheu-se a cultura num tanque refrigerado. Adicionou-se formalina a uma concentração de 10 ml/litro. Manteve-se a cultura, com agitação suave, a +4°C durante 2-24 horas e seguidamente centrifugou-se. Não se pretendeu que a formalina adicionada inactivasse completamente as bactérias, mas que parasse o crescimento e inibisse o metabolismo. Esta adição reduziu a lise celular com consequente contaminação com componentes intracelulares. A duração desta fixação foi entre 2 e 24 horas e tipicamente deixou-se a cultura durante a noite antes de ser centrifugada. Recolheu-se o sobrenadante contendo o polissacárido e rejeitou-se o sedimento bacteriano. O processo de purificação foi em geral efectuado numa câmara fria ou em condições em que a temperatura de produtos e reagentes é igual ou inferior a +10°C, com excepção da etapa de purificação de fenol que foi efectuada à temperatura ambiente. Após centrifugação da cultura, concentrou-se o sobrenadante da cultura. Precipitou-se o polissacárido de cápside do concentrado resultante por adição de centrimida para uma

concentração final de 5% P/V. A centrimida precipitou PS do fluido concentrado (SNF). Co-precipitaram também alguma proteína, ácido nucleico e lipopolissacárido (LPS). Recolheram-se os precipitados por centrifugação deixando alguns outros contaminantes e proteína no SNF. Recolheu-se o sedimento resultante por centrifugação e armazenou-se a ≤-20°C.

Ressuspenderam-se os sedimentos em solução de NaCl 0,3 M e centrifugou-se novamente a suspensão. O NaCl dissociou selectivamente os complexos polissacárido centrimida. No processo também se dissociaram alguns contaminantes (ácido nucleico, LPS, proteína). Adicionou-se ao sobrenadante etanol absoluto pré-arrefecido até uma concentração final de 60%. Recolheu-se o precipitado resultante por centrifugação e lavou-se com etanol absoluto frio. Secou-se o precipitado sob vácuo a 0-4°C e foi o produto intermediário. Dissolveu-se o produto intermediário em tampão de acetato de sódio e com fenol à temperatura ambiente. Recolheu-se a fase aquosa por centrifugação contínua. A extracção com fenol e a centrifugação podem ser repetidas várias vezes e a fase aquosa foi dialisada e ultrafiltrada. Precipitou-se o polissacárido de cápside da solução ultrafiltrada por adição de etanol pré-arrefecido até uma concentração final de 60% na presença de NaCl 0,3 M. Recolheu-se o precipitado por centrifugação, lavou-se com etanol absoluto pré-arrefecido, acetona e éter e secou-se sob vácuo a 4°C. O precipitado seco foi então moído até um pó fino sob humidade baixa e este produto constitui o polissacárido de *Haemophilus influenzae* de tipo b.

Dissolveu-se o polissacárido purificado em água de modo a obter 5 mg de polissacárido por ml de solução e ajustou-se o pH a 10,8 ± 0,2 com NaOH. Adicionou-se brometo de cianogénio sob a forma de solução em água nas proporções de 0,5 mg de CNBr/mg de polissacárido. Manteve-se o pH da mistura reaccional com NaOH a 10,8 ± 0,2 durante 35 a 40 minutos a 23° ± 3°C. Baixou-se o pH para pH 9 por adição de HCl. Adicionou-se di-hidrazida de ácido adápico para obter uma concentração final de 3,5 mg ADH/mg de polissacárido e ajustou-se o pH a 8,5. Incubou-se a mistura reaccional a 23 ± 3°C durante 15 minutos (pH mantido a 8,5) e seguidamente incubou-se a solução durante a noite a + 4°C, com agitação suave.

Dialisou-se a mistura reaccional contra solução de NaCl e seguidamente concentrou-se. A solução foi seguidamente filtrada através de um filtro de 0,45 μ e congelou-se a ≤-40°C. Este constitui o AH-polissacárido e foi armazenado a uma temperatura ≤-40°C.

Para produzir o componente de toxina de tétano, inoculou-se uma estirpe de *Clostridium tetani* numa série de tubos contendo 10 ml de meio Rosenow ou meio de tioglicolato. O meio Rosenow tem a seguinte composição:

Fórmula (em gramas por litro de água destilada)	
Peptona	10
Extracto de carne	3
Glucose	2
Cloreto de sódio	5
Indicador de “Andrade” (fucsina ácida a 5%)	10 ml
Mármore branco	1 peça
Cérebro	1 peça

Encheram-se os tubos com meio, preparado imediatamente antes de utilização a partir de produtos prontos a utilizar, e esterilizou-se a 120°C durante 20 minutos.

Inoculou-se um frasco de 5 litros contendo 3 litros de meio "Massachusetts" com *C. tetani* e incubou-se durante 16 a 18 horas a 35 ± 1°C durante 16 horas. O conteúdo foi seguidamente transferido para um frasco de 20 litros contendo 15 litros de meio "Massachusetts" estéril e incubou-se durante 8 horas a 35°C ± 1°C. Cada frasco foi utilizado para inocular um fermentador contendo 582 litros de meio "Massachusetts" e incubou-se a 35°C durante 5 a 6 dias com arejamento. Arrefeceram-se os fermentadores e adicionou-se à cultura 12 kg de cloreto de sódio, 8 kg de citrato trissódico. Manteve-se a agitação durante um dia, seguidamente parou-se e este processo permite a extracção da toxina residual das bactérias no final da cultura. Clarificou-se a toxina quer por filtração, quer por passagem através de uma centrífuga contínua.

Concentrou-se o sobrenadante de uma cultura de 1200 l por ultrafiltração e submeteu-se a toxina concentrada a

diafiltração contra solução de fosfato dissódico 0,07 M pH 8,2. Ajustou-se o volume final a 500 Lf/m.

Efectuou-se uma dupla precipitação com sulfato de amónio para obter a toxina de tétano purificada. Assim, adicionam-se lentamente sulfato de amónio e 10 g de carvão por litro da toxina diafiltrada previamente obtida. Após 16 a 24 horas de incubação a +4°C, filtrou-se a toxina em cartuchos para eliminar o precipitado. Seguidamente, adiciona-se lentamente uma quantidade de sulfato de amónio suficiente para obter 320 g/L por litro do sobrenadante obtido previamente. Após cerca de 48 horas a +4°C, recolhe-se o sedimento por centrifugação e dissolve-se em solução de sulfato dissódico 0,05 M pH 8,2. Diafiltra-se a solução contra solução de fosfato dissódico 0,05 M pH 8,2 e ajusta-se a 300 Lf/ml. A solução foi então esterilizada por filtração. Adicionaram-se 7,5 μ moles (0,225%) de formaldeído por ml da solução de toxina. Obteve-se desintoxicação após incubação durante 24 dias a +37°C incluindo períodos intermediários a +4°C e +22°C. Efectuou-se esterilização por filtração (0,22 μ) para obter o toxóide de tétano. Dialisou-se o toxóide de tétano e concentrou-se contra NaCl utilizando uma membrana com um limite de corte de peso molecular ≤ 50 000. Seguidamente, filtrou-se assepticamente a proteína concentrada e armazenou-se a +4°C.

Misturaram-se quantidades iguais de AH-polissacárido e toxóide de tétano (± 20%) com NaCl 0,05 M para obter uma concentração de 7,5 mg de polissacárido por ml. Ajustou-se o pH da solução a pH 5,7 + 0,2 com HCl e adicionou-se 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) para obter uma concentração final de 19,17 mg de EDAC/ml de mistura reaccional. Os grupos carboxilo da proteína de tétano são activados por ligação a EDAC. Sob as condições ligeiramente ácidas da reacção, segue-se uma reacção de condensação na qual o AH-PS e a proteína de tétano activada por EDAC se ligam covalentemente. Incuba-se a mistura a pH constante (5,7) durante 60 minutos a + 4°C e seguidamente o pH é ajustado a pH 6,9 ± 0,2 com NaOH e dialisou-se a mistura reaccional contra NaCl a + 4°C. Purificou-se o conjugado por centrifugação por zona num gradiente de sacarose (4% a 60%) para eliminar EDAC, AH-polissacárido livre, proteína de tétano

livre e conjugado de baixo peso molecular. Adicionou-se então à fracção contendo o conjugado de polissacárido água isenta de pirogénios, sacarose, tampão Tris-HCl para obter uma solução de conjugado com a seguinte composição:

sacarose a 8,5% P/V ± 0,5%
polissacárido conc. aproximadamente 200 μg/ml
tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 ± 0,5.

A solução foi seguidamente filtrada assepticamente utilizando um filtro de 0,2 μ e armazenou-se -40°C.

Diluiu-se a solução em bruto do conjugado de polissacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b sob condições estéreis com diluente de modo a obter a seguinte composição final:

Solução em bruto de conjugado de polissacárido de *Haemophilus* tipo b concentrado	até 200mg de polissacárido
Tampão Tris-HCl 200 mM para pH 7,2	até 10 mM
Sacarose	até 850 g
Água para injecção	até 10 l

O volume total final foi colocado em frascos e liofilizado. (A vacina liofilizada foi reconstituída com 0,5 ml ou NaCl a 0,4% para utilização).

(b) Formulação

Foram ensaiadas duas formulações da vacina de componentes multivalente (APDT). A primeira (baixa APDT) continha 10 μg de toxóide de *pertussis* (PT), 5 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA), 5 μg de fímbrias 2 e 3 μg de proteína de 69 K (69K) por dose de 0,5 ml (CLASSIC). A segunda formulação (alta APDT) continha o dobro da quantidade de PT (20 μg) e quantidades idênticas de FIM e 69K (HYBRID). Ambas as formulações continham 15 Limites de floculação (Lf) de toxóide de difteria, 5 Lf de toxóide de tétano, 1,5 mg de fosfato de alumínio como adjuvante e 2-fenoxietanol a 0,6% como conservante. A vacina conjugada Hib-toxóide de tétano (PRPT) foi produzida, da forma descrita supra, por Connaught Laboratories Inc. (Swiftwater, E.U.A.)

População

Foram recrutados para o estudo crianças saudáveis de 17 a 21 meses de idade que tinham sido imunizadas com três doses de baixa APDT ou PRPT como injecções separadas aos 2, 4 e 6 meses de idade num estudo clínico prévio. Após consentimento informado por escrito, as crianças foram distribuídas através de uma lista de blocos equilibrados de números aleatórios gerados por computador para receber PRT-T como uma injecção independente no mesmo dia, ou como injecção independente com a PRP-T administrada um mês após a vacina APDT ou como uma injecção única (PRP-T liofilizada reconstituída em APDT). A formulação APDT (alta ou baixa) para cada criança permaneceu a mesma administrada nas primeiras três doses (razão de distribuição 6:1 alta APDT; baixa APDT). As vacinas foram administradas i.m. com uma agulha de 25 mm no músculo deltóide do braço ou no músculo vasto lateral da coxa caso o deltóide não tenha massa suficiente. Quando é necessária uma segunda injecção para PRPT, injecta-se o membro oposto.

Monitorização clínica e laboratorial

Os participantes foram monitorizados relativamente a reacções secundárias locais e sistémicas imediatamente após a imunização e pelos pais no intervalo de 72 horas após imunização. Os dados foram recolhidos através de uma entrevista telefónica estruturada às 24 e 72 horas. Mediu-se a temperatura corporal pelo menos uma vez por dia ou sempre que os pais suspeitassem que a criança estava febril. A sensibilidade e as reacções sistémicas (irritabilidade, actividade diminuída, alimentação diminuída) foram classificadas como brandas, moderadas ou graves de acordo com critérios pré-estabelecidos a partir dos quais os pais seleccionaram uma gravidade com base em exemplos estruturados. As reacções locais medidas foram classificadas relativamente ao seu tamanho e o choro prolongado relativamente à sua duração.

Recolheram-se amostras de sangue por venipunctura ou por picada do dedo antes e 28 dias após imunização; em crianças a que foi administrada a injecção de PRP-T (consequentemente, 2 meses após APDT). Mediram-se os anticorpos contra o polissacárido de cápside de Hib (PRP) por RIA. Os anticorpos IgG contra PT foram medidos por ELA e o anticorpo de

neutralização de PT por neutralização de citotoxicidade de células de ovário de "hamster" chinês (CHO). Os anticorpos IgG anti-FHA, anti-FIM e anti-69K foram medidos por EIA; a quantidade presente numa unidade foi calculada utilizando o anti-soro de referência (nº 3) de FDA EUA. Mediram-se também as aglutininas de *pertussis*. A anti-toxina de difteria foi medida por ensaio de microneutralização e a anti-toxina de tétano por EIA. Os títulos de anticorpo foram expressos como médias geométricas de título; às amostras de soro com títulos inferiores ao limite de detecção do ensaio atribuiu-se um valor de metade do menor limite de detecção para os efeitos de cálculos estatísticos.

Análise estatística

As reacções secundárias foram analisadas após agrupamento relativamente à sua significância clínica. As taxas de reacções secundárias foram comparadas por estimativa de Mantel-Haenszel de risco relativo utilizando centro e formulação de vacina como variáveis de estratificação. Estimaram-se em cada caso estimativas pontuais e IC 95% de RR. Os IC que não incluem 1,00 são estatisticamente significativos.

Calcularam-se as médias geométricas dos títulos de anticorpos e os IC 95% para o título de anticorpo para cada antigénio da vacina antes e após imunização. Compararam-se as médias de logaritmo dos títulos por análise de variância de três factores. A proporção de indivíduos que atinge níveis pré-especificados em cada grupo foi comparada por regressão logística. Não se efectuaram quaisquer ajustes para comparações múltiplas.

Incluíram-se no estudo um total de 545 crianças (44% do sexo feminino), 74% das quais tinham concluído o estudo da série dos bebés. A proporção de participantes neste estudo que receberam as duas formulações permaneceu 6:1 (468 alta APDT, 77 baixa APDT). A idade média foi de 18,9 meses (gama 17-21 meses); todas as crianças com excepção de 3 (99,4%) completaram o estudo.

Reacções secundárias

As taxas de reacções secundárias não diferiram em grupos imunizados com alta APDT ou baixa APDT; as taxas foram também semelhantes independentemente das imunizações terem sido administradas separadamente numa visita, em visitas separadas ou numa única injecção combinada.

Resposta de anticorpos

Antes de imunização, os níveis de anticorpos contra todos os antigénios excepto FHA foram semelhantes em crianças que receberam alta APDT ou baixa APDT nas suas primeiras três doses. As crianças iniciadas com alta APDT com o seu teor de FHA quatro vezes superior apresentaram títulos de FHA significativamente maiores do que as crianças imunizadas com baixa APdT (p-0,0001). Após imunização, alta APDT induziu títulos de anticorpos mais elevados do que baixa APDT (p=0,0001). Contrariamente, os títulos de anti-PT pré-imunização medidos por neutralização CHO ou EIA foram semelhantes nos dois grupos. Paradoxalmente, apesar do teor de antigénio ser o dobro, os títulos de anti-PT foram mais baixos após imunização com alta APDT do que com baixa APDT (p=0,038). De igual modo, os anticorpos anti-FIM e aglutinina após imunização foram maiores no grupo de baixa APDT (p=0,01 e p=0,04, respectivamente) apesar de quantidades iguais de antigénio fimbrial em ambas as formulações de vacina.

Antes de imunização, existiam pequenas diferenças entre os anticorpos anti-*pertussis* dentro do grupo randomizado para receber a PRPT combinada com APDT como uma injecção única ou administradas em injecções separadas no mesmo dia ou em dias separados (Tabela 9). Os dados apresentam-se separadamente para os indivíduos que receberam alta APDT ou baixa APDT; no entanto, dado o pequeno número de crianças no grupo de baixa APDT, estes resultados não serão discutidos adicionalmente. O grupo randomizado para receber injecções separadas no mesmo dia apresentou níveis de anticorpos anti-PT mais elevados por neutralização CHO do que o grupo que iria receber as duas injecções em dias separados (6,14 contra 4,80 unidades; p <0,05). Os níveis de anticorpos após imunização foram também superiores neste grupo (176 unidades) do que no grupo de injecções separadas em dias separados (122 unidades; p <0,01) embora se tivessem verificado níveis elevados semelhantes no

grupo a que foi administrada a imunização combinada única (171 unidades; p <0,01). Detectou-se resposta de anticorpos anti-69K neste grupo após imunização, embora as crianças imunizadas com duas injecções no mesmo dia apresentassem uma resposta de anticorpos superior à de crianças imunizadas com a vacina combinada única e crianças imunizadas com duas injecções no mesmo dia apresentaram respostas de anticorpos mais elevados do que crianças imunizadas em dias separados (243 contra 190 unidades; p <0,001) do que crianças imunizadas com duas injecções em dias separados.

Os níveis de anticorpo anti-PRP foram semelhantes nos três grupos antes de imunização. Os títulos após imunização foram maiores em crianças imunizadas com injecções separadas no mesmo dia (66,0 μg/ml) do que em crianças imunizadas em dias separados (28,4 μg/ml; p <0,001) ou em crianças a quem foi administrada a imunização combinada única (47,1; p <0,05). A imunização combinada também provocou níveis de anticorpos significativamente maiores do que as vacinas administradas em dias separados (p <0,05). Não se detectaram quaisquer diferenças entre os grupos na percentagem que atingiu níveis "protectores"; todas os participantes apresentaram títulos após imunização superiores a 0,15 μg/ml e somente 4 participantes (0-0,7%) não conseguiram atingir um título superior a 1 μg/ml (3 no grupo ao qual se administrou injecções separadas em dias separados e um no grupo ao qual se administrou a injecção combinada única). Mais de 82% das crianças em cada grupo excedeu um nível de anticorpo anti-PRP de 10 μg/ml.

Foi também provocada uma resposta de anticorpos vigorosa contra os toxóides de difteria e de tétano. Comparativamente ao grupo ao qual se administrou a imunização em dias separados (2,1 UI/ml) desencadearam-se níveis de anticorpos anti-difteria significativamente maiores em crianças imunizadas com duas injecções no mesmo dia (3,1; p <0,01 UI/ml) ou as injecções únicas combinadas (3,3 UI/ml; p < ,001). Os anticorpos anti-tétano foram maiores em recebedores das duas injecções no mesmo dia (6,7 UI/ml) do que em crianças imunizadas em dias separados (5,2 UI/ml; p <0,01) ou crianças a que foi administrada a injecção única combinada (4,8 UI/ml; p <0,001). Todas as crianças apresentaram títulos de

anticorpos anti-difteria e anti-tétano pós-imunização superiores a 0,1 UI/ml, um nível 10 vezes superior ao suposto nível protector. Mais de 96% dos títulos anti-tétano e mais de 74% dos títulos anti-difteria excederam um nível de 1,0 UI/ml; não se verificaram quaisquer diferenças entre os grupos de imunização.

Exemplo 8

Este exemplo descreve a formulação e imunogenicidade de uma vacina de combinação multivalente contendo vacina polio inactivada.

(a) Preparação de poliovírus inactivado

(i) Cultura em células MRC-5

Os poliovírus inactivados cultivados em células MRC 5 foram produzidos da seguinte forma. As células foram de células de rim de um macaco verde (*Ceropithacus aethiops*):

A vacina de poliovírus trivalente, inactivada continha componentes do tipo I (Mahoney), tipo II (MEF) e tipo III (Saukett), que foram cultivados em células MRC-5 em pérolas microtransportadoras, processados e inactivados separadamente antes de combinação numa vacina de poliovírus trivalente.

Adicionou-se uma suspensão de células MRC-5 a meio de cultura celular num fermentador a pH 7,2 (6,9 a 7,6) e à temperatura de 37°C ± 0,5°C. O meio de cultura celular tinha a seguinte composição:

Meio CMRL 1969
Bicarbonato de sódio a 0,15%
Soro de bovino adulto a 5,00% - 7,00%
Sulfato de neomicina (µg de actividade) 10 UI/ml
Polimixina B 200 UI/ml

O meio CMRL tinha a seguinte composição:

PÓ SECO

Ingredientes	mg/litro
Aminoácido	
L-Alanina	25,0
L-Arginina (base livre)	58,0
Ácido L-Aspártico	30,0
L-Cisteína.HCl	0,1
L-Cistina dissódica	24,0
Ácido L-glutâmico.H_2O	67,0
L-Glutamina	200,0
L-Glicina	50,0
L-Histidina (base livre)	16,2
L-Hidroxiprolina	10,0
L-Isoleucina	20,0
L-Leucina	60,0
L-Lisina.HCl	70,0
L-Metionina	15,0
L-Fenilalanina	25,0
L-Prolina	40,0
L-Serina	25,0
L-Treonina	30,0
L-Triptofano	10,0
L-Tirosina	40,0
L-Valina	25,0
Vitaminas	
Ácido p-aminobenzóico	0,05
Ácido ascórbico	0,05
d-Biotina	1,00
Pantotenato de cálcio	1,00
di-hidrogenocitrato de colina	2,12
Ácido fólico	1,00
Glutationa	0,05
i-Inositol	2,00
Nicotinamida	1,00
Piridoxal.HCl	1,00
Riboflavina-5-fosfato	0,10
Tiamina HCl	1,00

Ingredientes Componente	mg/litro
Cloreto de sódio	8000,0
Cloreto de potássio	400,0
Cloreto de cálcio (anidro)	140,0
Sulfato de magnésio.$7H_2O$	200,0
Fosfato de sódio, dibásico anidro	180,0
Fosfato de sódio, não básico	70,0
D-glucose (anidro)	1000,0
Vermelho de fenol	20,0

10 852 g origina 1 litro de meio CMRL 1969.

O meio foi preparado da seguinte forma:

Adicionaram-se 450 litros de água isenta de pirogénios destilada a 905 ml de ácido clorídrico 1 N. Adicionou-se a esta mistura 5426,5 g de CMRL 1969 em pó seco com agitação contínua até totalmente dissolvido até solução límpida.

Adicionaram-se os seguintes produtos químicos na ordem apresentada, com agitação contínua, esperando que cada composto químico se dissolva antes de adicionar o seguinte:

Neomicina	10 mcg/ml
Polimixina B	200 unidades/ml
Solução tampão TES	5000,0 ml
Bicarbonato de sódio	750,0 g
Soro bovino	30,0 L

Ajustou-se o volume até 500 L com água destilada fresca e agitou-se até mistura uniforme.

Monitorizou-se o crescimento celular e quando se determinou que as células tinham atingido a fase logarítmica, rejeitou-se o meio de cultura gasto e substituiu-se com meio de cultura de vírus. O meio de cultura de vírus tinha a seguinte composição:

Produtos químicos de meio 199 com sais de Earle	
Bicarbonato de sódio	0,26%
Tween 80	20 ppm
Sulfato de neomicina (μg de actividade)	10 UI/ml
Polimixina B	200 UI/ml
L-glutamina	100 mg/l
L-arginina	29 mg/l
L-leucina	30 mg/l
L-isoleucina	10 mg/l
L-metionina	7,5 mg/l
L-serina	12,5 mg/l
L-treonina	15 mg/l
L-cistina	10 mg/l
Colina diH citrato	107 mg/l

O meio CMRL 199 tinha a seguinte composição:

PÓ SECO

Ingredientes	mg/litro
L-Alanina	25,0
L-Arginina (base livre)	58,0
Ácido L-aspártico	30,0
L-Cisteína .HCl .H_2O	0,1
L-Cistina dissódica	24,0
Ácido L-glutâmico H_2O	67,0
L-Glutamina	100,0
Glicina	50,0
L-Histidina (base livre)	16,2
L-hidroxiprolina	10,0
L-Isoleucina	20,0
L-Leucina	60,0
L-Lisina	70,0
L-Metionina	15,0
L-Fenilalanina	25,0
L-Prolina	40,0
L-Serina	25,0
L-Treonina	30,0
L-Triptofano	10,0
L-Tirosina	40,0
L-Valina	25,0
Ácido p-aminobenzóico	0,050

Ácido ascórbico	0,050
d-Biotina	0,010
Pantotenato de cálcio	0,010
Di-hidrogenocitrato de colina	1,060
Ácido fólico	0,010
Glutationa	0,050
i-Inositol	0,050
Menadiona	0,010
Nicotinamida (niacinamida)	0,025
Ácido nicotínico (niacina)	0,025
Piridoxal.HCl	0,025
Piridoxina.HCl	0,025
Riboflavina-5-fosfato	0,010
Tiamina HCl	0,010
Acetato de vitamina A	0,100
Vitamina D (calciferol)	0,100
Vitamina E (fosfato de -tocoferol)	0,010
Sulfato de adenina	10,000
Adenosina-trifosfato	1,000
Adenosina-5-ácido fosfórico	0,200
Desoxi-2-ribose	0,500
d-Ribose	0,500
Colesterol	0,200
Guanina	0,300
Hipoxantina	0,300

As culturas foram infectadas com o inóculo de vírus adequado, a uma multiplicidade de infecção. A infecção prosseguiu a 36°C ± 1°C. Quando se completou C.P.E. de vírus, arrefeceu-se a cultura de 2°C a 15°C.

A colheita de vírus foi clarificada por filtração. O volume de colheita de vírus foi reduzido por ultrafiltração de membrana, com um limite de peso molecular nominal de 100 000 a um volume adequado para diafiltração contra tampão fosfato 0,04 M. Após diafiltração, o volume concentrou-se adicionalmente a um volume adequado para filtração em gel. O concentrado de vírus vivo foi amostrado e armazenou-se de 2°C a 8°C.

O concentrado de vírus vivo foi aplicado a uma coluna de filtração em gel e eluiu-se da coluna com tampão fosfato

0,04 M. A fracção de vírus foi recolhida por monitorização da densidade óptica do eluato da coluna a 254 e 280 nm.

Foi efectuada uma segunda etapa de purificação utilizando um meio de permuta iónica DEAE, com fosfato 0,04 M como tampão de eluição. Esta etapa pode ser repetida duas vezes, caso a quantidade de meio de permuta iónica utilizado seja insuficiente, tal como determinado por monitorização a 254 e 280 nm.

A fracção de vírus recolhida foi concentrada e dialisada contra meio especial de Hank para reduzir o teor de fosfato. O meio especial de Hank tem a seguinte composição:

AMINOÁCIDOS	mg/litro
D,L-Alanina	25,00
L-Arginina.HCl	58,00
Ácido D,L-aspártico	30,00
L-Cisteína.HCl.H_2O	0,10
L-Cistina 2HCl	26,00
Ácido D,L-glutâmico	67,00
L-Glutamina	100,00
Glicina	50,00
L-Histidina HCl.H_2O	16,20
L-Hidroxiprolina	10,00
D,L-Isoleucina	20,00
D,L-Leucina	60,00
L-Lisina.HCl	70,00
D,L-Metionina	15,00
D,L-Fenilalanina	25,00
L-Prolina	40,00
D,L-Serina	25,00
D,L-Treonina	30,00
D,L-Triptofano	10,00
L-Tirosina (sal dissódico)	40,00
D,L-Valina	25,00
VITAMINAS	
Ácido ascórbico	0,050
d-Biotina	0,010
Vitamina D (Calciferol)	0,100
D-Pantotenato de cálcio	0,010
Cloreto de colina	1,060
Ácido fólico	0,010
i-Inositol	0,050

Sais minerais	mg/litro
Cloreto de cálcio (anidro)	40,00
Nitrato férrico.$9H_2O$	0,10
Cloreto de potássio	400,00
Cloreto de sódio	8000,00
Sulfato de magnésio.$7H_2O$	200,00
Outros ingredientes	
Sulfato de adenina	10,000
Adenosina trifosfato (sal dissódico)	1,000
Ácido adenílico	0,200
d α Tocoferol ácido fosfórico (sal de sódio)	0,010
Colesterol	0,200
Desoxirribose	0,500
Glucose	1000,000
Glutationa	0,050
Guanina.HCl	0,300
Hipoxantina (sal de sódio)	0,300
Ribose	0,500
Acetato de sódio.$3H_2O$	81,500
Timina	0,300
Tween 80	20,000
Uracilo	0,300
Xantina (sal de sódio)	0,300
Menadiona	0,010
Ácido nicotínico	0,025
Nicotinamida	0,025
Ácido p-aminobenzóico	0,050
Piridoxal.HCl	0,025
Piridoxina.HCl	0,025
Riboflavina-5-fosfato	0,010
Tiamina.HCl	0,010
Vitamina A (acetato)	0,140

A fracção de vírus purificada foi filtrada através de um filtro de porosidade de 0,2 μ.

Uma ou mais fracções do concentrado de vírus purificado podem ser reunidas para inactivação. Com base nos resultados de ensaio ELISA, o conjunto de vírus monovalente foi diluído a:

Tipo I: 1750 ± 250 DU/ml
Tipo II: 1500 ± 250 DU/ml e
Tipo III: 1250 ± 250 DU/ml com meio especial de Hank.

O conjunto monovalente foi aquecido a 37°C ± 1°C e seguidamente filtrado através de um filtro de porosidade 0,2 μ.

Adicionou-se a quantidade necessária de formalina para obter uma concentração de 1:4000. Misturou-se o conjunto de vírus e formalina e agitou-se continuamente a 37°C ± 1°C. Amostrou-se o conjunto de vírus monovalente para viabilidade. No sexto dia, filtrou-se o conjunto de vírus em inactivação através de um filtro de 0,2 μ e foi mantido a 37°C ± 1°C. No décimo terceiro dia de inactivação, o conjunto de vírus foi filtrado através de um filtro de 0,2 μ.

Seleccionaram-se uma ou mais componentes monovalentes inactivadas e conectaram-se assepticamente a um tanque de recolha. O conjunto monovalente foi concentrado adicionalmente por ultrafiltração de membrana, com um limite de peso molecular nominal de 100 000. A diálise contra diluente RIV-PBS:
Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4), 0,346 g/CCmL
Di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), 0,187 g/CCmL com Tween foi então efectuada para obter uniformidade do produto final.

Adicionou-se albumina (humana) para obter uma concentração final de 0,5%. O conjunto de concentrado monovalente foi então filtrado através de um filtro de 0,2 μ. Adicionou-se diluente RIV-PBS com Tween para obter uma concentração estimada (por cálculo) de 10 a 15 doses por 0,5 ml. O conjunto de concentrado foi armazenado de 2°C a 8°C até ser necessário.

Calcularam-se e combinaram-se os volumes adequados de componentes monovalentes de tipos I, II e III. A vacina trivalente foi projectada para conter:

Tipo I: 40 DU/dose de 0,5 ml
Tipo II: 8 DU/ dose de 0,5 ml
Tipo III: 32 DU/ dose de 0,5 ml

O concentrado trivalente foi armazenado de 2°C a 8°C até ser utilizado. Adicionaram-se e misturaram-se formaldeído e 2-fenoxietanol. Adicionou-se albumina (humana), por cálculo, para obter uma concentração final de 0,5%.

(ii) Cultura em células Vero

Cultivaram-se ampolas do banco de células activas trabalho Vero até ao nível de passagem celular seleccionado. Conservaram-se as ampolas de células em azoto líquido. Cultivaram-se as células utilizando pérolas de micro-suporte que foram pérolas esféricas com um diâmetro médio de cerca de 100 micrómetros, constituídas por polímeros de dextrano contendo radicais de DEAE ligados à sua superfície (dietilaminoetilo), que lhes confere uma carga positiva.

O meio básico para cultura celular foi o "meio mínimo essencial" (MEM) de Eagle em solução salina de Earle enriquecida com hidrolisado de lactalbumina a 0,2 %, dextrose a 0,1 %, soro de vitelo a 5 %. Cada ml de meio contém os seguintes antibióticos:

Estreptomicina	:	75 unidades por ml
Neomicina	:	14 unidades por ml
Sulfato de polimixina B	:	35 unidades por ml

As células Vero foram progressivamente subcultivadas em biogeradores de tamanho crescente. Seguidamente, introduziram-se meio de cultura e o volume suficiente de pérolas de micro-suporte por litro de meio no biogerador industrial. Estabilizou-se a temperatura a +37°C. Adicionaram-se as células recolhidas por tripsinação e colocaram-se em agitação. Continuou-se a cultura durante 4 a 7 dias a +37°C, sendo a agitação aumentada progressivamente. Usualmente, no final da cultura, verificou-se um aumento de 6 a 20 vezes no crescimento celular. O meio utilizado para a cultura de vírus foi meio 199 (Parker) em solução salina de Earle, enriquecido com dextrose a 0,1 %. Este meio contém os mesmos antibióticos, na mesma concentração do meio de cultura celular, mas não contém soro de vitelo. No 4°/7° dia de cultura celular, parou-se a agitação do biogerador na etapa industrial; as pérolas sedimentaram no fundo do tanque e remove-se o meio velho. Introduziu-se então algum meio 199 isento de soro em cada biogerador e agitou-se. Este meio foi então removido,

efectuando uma lavagem das pérolas e células. Transferiu-se algum meio 199 isento de soro para o biogerador conjuntamente com o volume necessário de lote de inóculo. O vírus foi adsorvido pelas células por agitação suave. No final da cultura de vírus, parou-se a agitação. Retirou-se a suspensão de vírus e recolheu-se e retiveram-se as pérolas por filtração. Homogeneizou-se a suspensão de vírus. A cultura, filtrada numa membrana orgânica de tamanho de poro médio de 0,20 mm, foi armazenada a +4°C. Concentrou-se o vírus por ultrafiltração.

O vírus foi purificado adicionalmente por cromatografia de permuta iónica utilizando um suporte DEAE-dextrano-Spherosil, equilibrado com tampão fosfato 0,04 M, pH = 7,00. O vírus foi purificado adicionalmente por cromatografia de filtração em gel, utilizando uma coluna contendo um gel de agarose, Sepharosis CL-6B tamponada com fosfato 0,04 M, pH = 7,00. O vírus foi purificado adicionalmente por cromatografia utilizando DEAE dextrano-Spherosil, tamponada com um tampão fosfato 0,04 M, pH = 7,00. Imediatamente após efectuar a última purificação, ajustou-se a suspensão de vírus ao volume necessário com algum meio M-199, pH = 7,0 sem fosfato, concentrou-se dez vezes em EDTA 5 mm, glicina a 0,5 % e Tween 80 a uma concentração final de 50 mg/litro (meio de inactivação). Esta mistura constitui uma "mistura de vírus concentrada" e filtra-se numa membrana de 0,2 μm. Armazenou-se a suspensão de vírus concentrada a +4°C aguardando inactivação.

Misturaram-se um ou vários lotes de "mistura de vírus concentrada" do mesmo tipo e possivelmente diluiu-se ou ajustou-se com algum "meio de inactivação" num tanque adequado. A diluição foi ajustada ao volume correcto de acordo com os tipos de modo a obter um título de antigénio D entre:
- 1500 e 2000 unidades D em tipo 1
- 800 e 1000 unidades D em tipo 2
- 1000 e 1500 unidades D em tipo 3

e uma taxa de proteína de:
- ≤40 μg/ml em tipo 1
- ≤70 μg/ml em tipo 2
- ≤30 μg/ml em tipo 3.

A suspensão de vírus concentrada purificada ajustada foi filtrada numa membrana de 0,22 μm no máximo 72 horas antes do início de inactivação. A suspensão de vírus foi então de novo aquecida a +37°C. Para inactivação, adicionou-se solução de formaldeído para obter uma concentração de 1/4000. De modo a seguir a cinética de inactivação após 24, 48, 72 e 96 horas, obtiveram-se amostras durante os primeiros quatro dias. Efectuou-se uma amostragem de 10 ml com neutralização imediata do formaldeído por acção de bissulfito de sódio e armazenagem directa a -20°C aguardando titulação.

No 6° dia, a suspensão de vírus durante inactivação foi filtrada utilizando um filtro de 0,22 μm. Após a filtração, efectuou-se incubação do líquido a +37°C durante mais 6 dias com uma agitação constante. No 9° dia de inactivação, retirou-se 3 vezes o volume correspondente a 3000 doses humanas e no mínimo 500 mL da cultura individual impura. Este volume foi calculado de acordo com o título em antigénio D da "mistura de vírus concentrada". A amostra foi neutralizada directamente com algum bissulfito de sódio para parar a acção do formaldeído residual. A suspensão de vírus homogeneizada e inactivada foi então retirada do incubador a +37°C após o 12° dia de inactivação. O volume foi directamente neutralizado com algum bissulfito de sódio e armazenado a +4°C.

Para preparar um lote trivalente concentrado de IPV combinaram-se preparações monovalentes para proporcionar:

Tipo 1 (Mahoney)	400 unidades de antigénio D
Tipo 2 (MEF-1)	80 unidades de antigénio D
Tipo 3 (Saukett)	320 unidades de antigénio D
Meio 199- pH 7,2 q.b. para	1 ml

Agitou-se a mistura para homogeneizar e filtrou-se numa membrana de porosidade de 0,22 micra.

O produto em bruto foi obtido a partir de lotes em bruto trivalentes concentrados, tais como os descritos, por diluição com meio 199, pH 7,2, sem vermelho de fenol de modo que a unidade de dosagem contém por 0,5 ml.

40 unidades de antigénio D para tipo 1
8 unidades de antigénio D para tipo 2
32 unidades de antigénio D para tipo 3.

(b) Formulações

A formulação de vacina multivalente (APDT) continha cinco antigénios de *pertussis* (10 μg de PT, 5..μg de FHA, 5 μg de FIM 2 e 3, 3 μg de 69K), 15 Lf de toxóide de difteria, 5 Lf de toxóide de tétano, 1,5 mg de fosfato de alumínio como adjuvante e 2-fenoxietanol a 0,6% como conservante por 0,5 ml (CLASSIC). A vacina foi utilizada sozinha ou em combinação com IPV produzido em células MRC-5 (mIPV) preparado tal como descrito supra, IPV produzido em células Vero (vIPV) preparado como descrito supra ou com OPV (Connaught Laboratories Limited). De modo a não perturbar o seu calendário de imunização de rotina, administrou-se a vacina conjugada de *Haemophilus influenzae* b-toxóide de tétano na visita de seguimento.

População

Recrutaram-se neste estudo crianças saudáveis de 17 a 19 meses de idade que tinham sido imunizadas com três doses de DTP e 2 doses de OPV ou 3 doses de DTP-IPV antes dos 8 meses de idade. Após consentimento informado por escrito dos pais ou tutores, distribuíram-se as crianças através de uma lista de blocos equilibrados de números aleatórios gerados por computador para receber um de cinco regimes de vacinas (Tabela 10?). As vacinas de combinação contendo A3DT foram administradas por via intramuscular com uma agulha de 25 mm no músculo deltóide do braço ou no músculo vasto lateral da coxa caso o deltóide não tivesse massa suficiente. IPV (0,5 ml; mIPV ou vlPV) quando administrados sozinhos foram administrados por via subcutânea utilizando uma agulha com ½ a 5/8 polegadas (12,5 a 16 mm) de comprimento, as vacinas contendo APDT foram administradas no membro esquerdo; o membro direito foi utilizado para as vacinas de poliovírus inactivado quando administradas separadamente e para todas as vacinas conjugadas com *Haemophilus influenzae* b na segunda visita.

Monitorização clínica e laboratorial

As amostras de sangue foram recolhidas por venipunctura ou por picada do dedo antes e 28 dias após a imunização. Os

anticorpos IgG contra PT foram medidos por imunoensaio enzimático e anticorpo de neutralização PT por neutralização CHO. Os anticorpos IgG anti-FHA, anti-FIM e anti-69K foram medidos por imunoensaio enzimático; as unidades foram calculadas utilizando o anti-soro de referência de FDA de EUA (nº 3). Mediram-se também as aglutininas de *pertussis*. A anti-toxina de difteria foi medida por ensaio de micro-neutralização e a anti-toxina de tétano por imunoensaio. Os anticorpos de anticorpo-poliovírus do tipo 1, 2 e 3 foram medidos por neutralização vírica. Os títulos de anticorpo foram expressos como médias geométrica de título; às amostras de vírus com títulos inferiores ao limite de detecção do ensaio foram atribuídos valores de um meio do menor limite de detecção para propósitos de cálculos estatísticos.

As médias geométricas dos títulos de anticorpo e os intervalos de confiança a 95% foram calculados para o título de anticorpo para cada antigénio da vacina antes e após imunização. Compararam-se os logaritmos da média dos títulos de anticorpo e os aumentos dos logaritmos da média dos títulos de anticorpo por análise de perfil e análise de variância. A proporção de indivíduos que atingem níveis pré-especificados em cada grupo foi comparada por regressão logística. Foram efectuadas comparações entre cada vacina de poliovírus administrada separadamente ou como injecção combinada, entre mIPV e vIPV (ambos separadamente e combinados) e entre as vacinas IPV combinadas e OPV. Não foram feitos quaisquer ajustes para comparações múltiplas.

Incluíram-se no estudo um total de 425 crianças (52% do sexo feminino) e receberam a imunização de reforço (Tabela 10). A idade média de recrutamento foi de 17,8 meses (gama 17,0 a 20,0). Obtiveram-se espécimes de soro após a imunização de 422 (99,3%) participantes, em média 29,2 dias após imunização (gama 28 a 41 dias). Os eventos adversos categorizados como graves foram raros no estudo.

Antes da imunização, os níveis de anticorpo foram equivalentes entre os grupos para a maioria dos antigénios. As excepções foram os participantes atribuídos para receberem APDT e mIPV como injecções separadas que apresentavam níveis de anticorpos anti-FIM, aglutinina, anti-difteria e anti-

tétano significativamente menores do que o grupo atribuído para receber a vacina APDT-mIPV combinada. De igual modo, o grupo randomizado para receber as injecções separadas de APDT e vIPV apresentavam níveis de anticorpo anti-tétano menores do que o grupo que recebeu APDT-vIPV combinada.

Após imunização, ocorreu um aumento significativo de anticorpos em todos os grupos de vacinas contra todos os antigénios incluídos nas vacinas. Verificaram-se pequenas diferenças na resposta de anticorpos a antigénios de *pertussis* dependendo do grupo de vacina de polio. Não se verificaram quaisquer diferenças no anticorpo anti-PT por imunoensaio enzimático ou neutralização CHO ou nos anticorpos anti-FHA. Os anticorpos anti-69K foram significativamente maiores no grupo a que foi dada a vacina mlPV combinada com APDT (77,7 unidades) do que no grupo a que foi dado mIPV como uma injecção separada (37,9 unidades; $p < 0,001$) ou o grupo a que foi dado OPV (47,7; $p < 0,05$). Os anticorpos anti-FIM e aglutininas foram também maiores no grupo a que foi dado APDT-mIPV combinados do que no grupo a que foi dado injecções separadas; no entanto, estas mesmas diferenças foram também detectadas nos soros pré-imunização.

Detectaram-se diferenças nas respostas de anticorpos anti-poliovírus. Tanto APDT-mlPV como APDT-vIPV provocaram anticorpos anti-poliovírus tipo 1 e tipo 3 maiores ($P <0,001$ para todas as comparações). Os níveis de anticorpos anti-poliovírus do tipo 2 foram também maiores após APDT-mlPV (10 633 diluição recíproca) e APDTvIPV (10 256) do que OPV (7185); contudo, tal só atingiu significância estatística para APDT-mIPV ($p <0,05$). Os títulos de anticorpos anti-poliovírus atingidos com APDT-MIPV combinados foram também maiores do que quando se administrou mIPV como uma injecção separada (6620-1 $p <0,05$).

Os títulos de anticorpos anti-tétano foram maiores em recebedores de OPV do que em qualquer das combinações IPV ($p <0,05$). Os títulos anti-difteria foram também maiores em recebedores OPV mas tal só atingiu significância estatística comparativamente ao grupo APDT-vIPV ($p <0,05$). Após imunização, todas as crianças apresentavam níveis de

anticorpos contra difteria e tétano superiores a 0,01 UI/ml e todas as crianças excepto uma apresentavam níveis superiores a 0,1 UI/mi.

Os resultados deste estudo demonstram que uma vacina de componente *pertussis* contendo PT, FHA, 69K e FIM combinada com toxóides de difteria e tétano pode também ser combinada com vacina poliovírus inactivado sem qualquer aumento significativo em reactogenicidade ou perda de imunogenicidade. Contrariamente aos resultados com DTP de células completas, não ocorreu diminuição da resposta de anticorpos a antigénios de *Bordetella pertussis*. Não ocorreram diferenças significativas entre as vacinas IPV preparadas em linhas celulares MRC-5 ou Vero; ambas as vacinas induziram maiores níveis séricos de anticorpos anti-poliovírus do que OPV. A demonstração da equivalência de mIPV e vIPV facilita a implementação da vacina de *pertussis* acelular em jurisdições com uma preferência para um IPV derivado de uma determinada linha celular.

Em conclusão da experimentação relatada neste exemplo, esta demonstra que uma vacina acelular de 5 componentes *pertussis* pode ser combinada com segurança com qualquer das duas vacinas IPV para a quarta dose de vacina entre os 17 e 19 meses de idade.

RESUMO DA REVELAÇÃO

Em resumo da presente revelação, o presente invento, que é definido pelas reivindicações anexas, proporciona novas preparação de antigénios *Bordetella* e não *Bordetella* para produzir uma vacina de *pertussis* multicomponentes. Tais vacinas são seguras, não reactogénicas, imunogénicas e protectoras em humanos.

Tabela 1. Vacinas de *pertussis* acelulares

Vacina	PT	Agente de desintoxicação química	FHA	P.69	AGG2	AGG3	Referência
AMVC	+	H_2O_2[a]	–	–	–	–	62
Mass PHL[b]	+	TMN[c]	–	–	–	–	63
Institut Mérieux	+	GI[d]	+	–	–	–	64
Smith-Kline	+	FI[e]/GI	+	–	–	–	32
	+	FI/GI	+	+	–	–	32
CAMR[f]	+	FI	+	–	+	+	65
Lederle/Takeda	+	FI	+	+	+	–	66
Connaught	+	GI	+	–	+	+	32
	+	GI	+	+	+	+	67

[a] Inactivada com peróxido de hidrogénio. [b] Massachussets Public Health Laboratories. [C] TNM, inactivado com tetranitrometano. [d] GI, inactivado com glutaraldeído. [e] FI, inactivado com formalina. [f] Centre for Applied Microbiology and Research.

Tabela 2

Respostas de anticorpo IgG a antigénio de *pertussis* e toxóides de difteria e tétano em adultos e crianças pequenas após imunização com placebo ou com toxóides de *pertussis* acelular (AP), difteria-tétano-*pertussis* (DTP) ou DTP acelular multicomponentes (ADTP).

	Adultos				Crianças			
	Antes de imunização		Após imunização ao dia 28		Antes de imunização		Após imunização	
	Placebo	AP $CP_{10/5/5/3}$	Placebo	AP $CP_{10/5/5/3}$	DTP	ADPTP $CP_{10/10/5/3}DT$	DTP	ADPTP $CP_{10/10/5/3}DT$
Toxóide de *pertussis*	16,45 (9,46-28,62)	22,78 (12,11-42,86)	16,56 (9,08-30,22)	415,87 (243,91-709,09)	43,71 (14,29-133,88)	15,45 (8,50-28,10)	221,32 (99,83-490,67)	306,55 (155,84-603,03)
Hemaglutinina filamentosa	15,24 (10,28-22,60)	23,59 (15,59-35,69)	13,36 (7,71-23,16)	317,37 (243,05-141,41)	2,93 (1,81-4,73)	3,86 (3,03-4,93)	30 06 (11,82-76,46)	29 86 (16,51-53,99)
Aglutino-génios	21,26 (12,14-37,23)	28,64 (12,20-67,21)	27,0 (15,37-47,78)	2048,00 (1025,62-4089,55)	26,72 (16,94-42,15)	29,24 (13,63-62,75)	315,2 (127,4-779,9)	1243,3 (594,8-2603,5)
Pertactina	7,89 (4,00-15,56)	11,47 (6,41-20,55)	7,46 (3,51-15,87)	855,13 (396,41-1844,67)	6,54 (2,79-15,33)	9,45 (5,50-16,23)	60,13 (24,59-147,04)	116,16 (57,87-233,19)
Ensaio de neutralização de células CHO	12,30 (6,97-21,68)	21,11 (10,35-43,06)	10,78 (5,54-20,97)	604,67 (403,82-405,41)	27,47 (7,36-102,62)	9,71 (4,71-20,03)	270,60 (24,6-1100,8)	342 51 (146,6-800,2)
Toxóide de difteria	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	8,75 (6,52-23,92)	9 65 (5,62-16,57)
Toxóide de tétano	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	4,11 (3,20-5,28)	6,32 (5,31-7,53)
N° estudado	16	15	16	15	10	25	12	**

Tabela 3. Resultados serológicos de vacinas de componente *pertussis* em bebés (2, 4 e 6 meses de idade.

Ensaio clínico	Média geométrica de título										
	Produto	Estudo	N°. de partici-pantes	PT	FHA	69 kDa	Aglutino-génios fimbriais	Neutrali-zação de células CHO	Agluti-nação	Tet	Dif
1	$CP_{10/5/3}DT$	Estudo	108	38	37	3	229	160	85	7,8	0,8
	$CP_{10/5/5/3}DT$	comparativo	113	36	36	113	241	150	73	5,0	0,4
	Células completas (Mass.)	multicentro de	95	20	51	101	70	80	42	-	-
	Células completas (Lederle)	NIAID EUA (Ciclo I)	312	67	3	64	193	270	84	-	-
2	$CP_{10/5/5/3}DT$	Fase II Canadá	315	87,1	50,2	29,9	239,8	29,6	-	1,5	0,3
	Células completas (CLL)		101	20	4,7	6,4	603,2	2,6	-	1,2	0,4
3	$CP_{10/5/5/3}DT$	Fase IIB	32	58,4	45,2	40,6	111,4	32,7	-	1,0	0,14
	$CP_{20/20/5/3}DT$	Canadá	33	133,3	95,0	37,1	203,8	82,4		1,1	0,21
	Células completas (CLL)		30	10,4	8,9	6,8	393,9	4,0		1,8	0,31
4	$CP_{10/5/5/3}DT$	Fase IIC	42	105,1	82,5	71,1	358,6	66,9	307,0	2,0	0,33
	$CP_{20/20/5/3}DT$	Canadá	250	101,6	163,9	87,6	220,6	68,7	219,2	1,8	0,38
5	$CP_{20/20/5/3}DT$	Estudo de	58	212,7	83,4	106,3	601,9	109,6	-	1,9	0,53
	Células completas (CLL)	exequibilidade Montreal	58	101,4	11,7	16,8	906,9	6,0		1,1	0,27
6	$CP_{10/5/3}DT$	Estudo	80	42	34	50	310	196	185		
	$CP_{20/20/5/3}DT$	comparativo de	80	39	87	43	184	254	137	-	-
	Células completas (CLI)	NIAID EUA	80	2	3	9	33	54	167		
	Células completas (Lederle)	(Ciclo II)	80	18	2	16	129	137	86		

CLI - Connaught Laboratories Incorporated, Swiftwater, Pensilvânia
CLL - Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontário
Mass- Massachussets Public Laboratories
Lederle - Lederle Laboratories Inc.

TABELA 4- Eficácia de vacinas acelulares contra *pertussis*

Vacina	Eficácia %	
	A	B
$CP_{10/5/5/3}DT$	84,7 (80,3→88,5)[1]	77
$PT_{25}.FHA_{25}DT$	58 (49,8→64,8)[1]	
DPT[2]	47,9 (37,1→56,9)[1]	

A: definição do caso: 21 dias de tosse espasmódica e cultura positiva
B: definição do caso: tosse de *pertussis* moderada durante pelo menos um dia
Nota 1: limites de confiança
Nota 2: vacina de *pertussis* de células completas

TABELA 5

VACINA	N	GMT (IC 95%)	%≥0,15	%≥1,0
HCPDT-vIPV-PRP-T (líquido)	327	4,76 (4,12-5,50)	97,9	88,4
HCPDT-mIPV para reconstituir PRP-T	322	4,37 (3,74-5,09)	98,4	84,5
HCPDT-mIPV e PRP-T (separadas)	108	3,83 (3,05-4,80)	100	88,9
DPT-IPV para reconstituir PRP-T	105	3,84 (2,90-5,07)	97,1	81,0

TABELA 6

VACINA	N	POLIO 1	POLIO 2	POLIO 3
HCPDT-vIPV-PRP-T (líquido)	328	624 (533-732)	2397 (2043-2814)	1268 (1082-1485)
HCPDT-mIPV para reconstituir PRP-T	323	718 (589-875)	2173 (1837-2570)	1 938 (1640-2291)
HCPDT-mIPV e PRP-T (separadas)	108	702 (513-960)	2595 (2005-3360)	1 837 (1362-2477)
DPT-mIPV para reconstituir PRP-T	105	889 (630-1255)	2597 (2000-3373)	2726 (2108-3525)

TABELA 7

ANTIGÉNIO	HCPDT-vIPV-PRP-T (líquido) (n=324)	HCPDT-mIPV para reconstituir PRP-T (n=322)	HCPDT-mIPV e PRP-T (separadas) (n=108)	DPT-mIPV para reconstituir PRP-T (n=105)
PT	86,7 (80,9-93,0)	89,1 (82,5-96,1)	102,6 (90,5-116,4)	15,2 (12,2-19,0)
FHA	155,7 (147,2-164,7)	152,5 (143,6-162,0)	165,3 (148,4-184,3)	31,4 (27,2-36,2)
FIM	276,2 (242,2-315,1)	244,5 (211,4-282,7)	355,0 (279,4-451,1)	332,3 (264,6-417,3)
Pertactina	55,2 (48,7-62,5)	56,0 (49,4-63,4)	40,5 (33,0-49,7)	8,9 (6,8-11,7)
DIPH	0,29 (0,25-0,33)	0,28 (0,24-0,33)	0,36 (0,28-0,46)	0,29 (0,22-0,38)
TET	1,09 (1,00-1,19)	0,88 (0,80-0,96)	1,61 (1,40-1,86)	0,63 (0,51-0,78)

TABELA 8

ANTIGÉNIO	HCPDT-vIPV 1 injecção (n=85)	HCPDT+vIPV 2 injecções (n=84)	HCPDT-mIPV 1 injecção (n=87)	HCPDT+mIPV 2 injecções (n=81)	HCPDT+OPV HYBRID+OPV (n=85)
Difteria	4,1	4,57	4,99	3,89	6,19
Tétano	3,17	3,13	3,25	3,31	4,02
PT	73,9	68,2	80,5	65,2	86,8
FHA	93,9	98,1	112,8	117,8	120,9
Pertactina	63,8	45,1	77,7	37,9	47,7
FIM	922,7	809,1	1210	753,3	1215
Aglutininas	1278	1285	1606	1040	1532
Polio tipo 1	6672	5681	10242	8784	2110
Polio tipo 2	10256	7861	10633	6620	7185
Polio tipo 3	5771	7781	6798	8541	5563

TABELA 9

Combinação de PRP-T com vacina de componente *pertussis* quando administrada combinada ou separadamente no mesmo dia ou em dias separados

$CP_{10/5/5/3}DT$ (CLASSIC) e $CP_{20/20/5/3}DT$ (HYBRID) aos 19 meses (1 mês após)

ANTIGÉNIO	Classic/Hybrid para reconstituir PRP-T injecção única (n=181)	Classic/Hybrid e PRP-T injecções separadas no mesmo dia (n=181)	Classic/Hybrid e PRP-T injecções separadas em dias separados (n=180)
Anti-PRP	59,3	60,8	32,4
Difteria	3,7	3,3	2,4
Tétano	5,0	6,6	5,3
PT	120	114	96,1
CHO	195	189	136
FHA	102	99,3	87,5
Pertactina	187	223	168
FIM	430	434	315
Aglutininas	1004	1033	682

Nota: valores com letras combinadas diferiram significativamente ($p \leq 0,05$)

REFERÊNCIAS

1. Muller, A.S. Leeuwenburg, J. e Pratt, D.S. (1986) Pertussis: epidemiology and control. *Bull WHO* 64: 321-331.

2. Fine, P.E.M. e Clarkson, J.A. (1984). Distribution of immunity to pertussis in the population of England and Wales. *J. Hyg.* 92:21-26.

3. Mortimer, E.A. Jr. (1990). Pertussis and its prevention: a family affair. *J. Infect. Dis.* 161: 473-479.

4. Addiss, D.G., Davis, I.P., Meade, B.D., Burstyn, D.G. Meissner, M., Zastrow, J.A., Berg, J.L., Drinka, P., e Phillips, R. (1991). A pertussis outbreak in a Wisconsin nursing home. J. *Infect. Dis.* 164: 704-710.

5. Halperin, S.A. e Marrie, T.J. (1991a). Pertussis encephalopathy in an adult: case report and review. Rev. *Infect. Dis.* 13: 1043-1047.

6. Onorato, I.M., Wassilak, S.G. e Meade, B. (1992). Efficacy of whole-cell pertussis vaccine in preschool children in the United States. *JAMA* 267: 2745-2749.

7. Miller, D.L., Ross, E.M., Alderslade, R., Bellman, M.H., e Brawson, N.S.B. (1981). Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children. *Brit Med. J.* 282: 1595-1599.

8. Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., e Ishii, S. (1982). Subunit structure of islet-activating protein. pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21: 5516-5522.

9. Tuomanen, E. e Weiss, A. (1985). Characterization of two adhesins of Bordetella pertussis for human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 152:118-125.

10. Friedman, R-L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E.T., e Yocum D.E. (1992). Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* 60: 4578-4585

11. Pittman, M (1979). Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. Rev. *Infect. Dis.*, 1: 401-402

12. Granstrom, M. e Granstrom G. (1993). Serological correlates in whooping cough. *Vaccine* 11:445-448.

13. Gearing, A.J.H., Bird, C.R., Redhead, K., e Thomas, M. (1989). Human cellular immune responses to *Bordetella pertussis* infection. *FEMS Microbial. Immunol.* 47: 205-212.

14. Thomas, M.G., Redhead, K., e Lambert, H.P. (1989a). Human serum antibody responses to *Bordetella pertussis* infection and pertussis vaccination. *J. Infect. Dis.* 159: 211-218.

15. Thomas, M.G., Ashworth, L.A.E., Miller, E., e Lambert, H.P. (1989b). Serum IgG, IgA, and IgM responses to pertussis toxin, filamentous haemagglutonin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and immunization with whole-cell pertussis vaccine. *J. Infect. Dis.* 160: 838-845.

16. Tomoda, T., Ogura, H., e Kurashige, T. (1991). Immune responses to Bordetella pertussis infection and vaccination. *J. Infect. Dis.* 163: 559-563.

17. Petersen, J.W., Ibsen. P.H., Haslov, K., Capiau, C., e Heron, I. (1992a). Proliferative responses and gamma interferon and tumor necrosis factor production by lymphocytes isolated from trachcobroncheal lymph nodes and spleens of mice aerosol infected with *Bordetella pertussis. Infect. Immun.* 60: 4563-4570

18. Englund, J.A., Reed, G.F., Edwards, K.M., Decker, D., Pichichero, M.E., Ronnels, M.B., Steinhoff, M.C., Anderson, E.L., Meade, B.D., Deloria, M.A., e the NIAID Acellular Pertussis Vaccine Group. (1992b). Effect of transplacental antibody and development of pertussis toxin (PI) and filamentous haemagglutonin (FHA) antibody after acellular (AC) and whole cell (WC) pertussis vaccines in infants. *Pediat. Res.* 31:91A.

19. Oda, M., Cowell, J.L., Burstyn, D.G., Thaib, S., e Manclark, C.R. (1985). Antibodies to Bordetella *pertussis* in human colostrum and their protective activity against aerosol infection of mice. *Infect.* Immun. 47:441-445.

20. Petersen, J.W., P.H. Bentzon, M.W., Capiau, C., e Heron, I. (1991). The cell mediated and humoral immune response to vaccination with acellular and whole cell pertussis vaccine in adult humans. *FEMS Microbiol* Lett. 76: 279-288.

21. Oda,.M., Cowell. J.L., Burstyn, D.G., e Manclark, C.R. (1984). Protective activities of the filamentous haemagglutonin and the lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* in mice. *J. Infect. Dis.* 150: 823-833.

22. Sato, H., Ito, A.. Chiba, J. e Sato. Y. (1984b). Monoclonal antibody against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections. *Infect. Immun.* 46: 422-428.

23. Sato, H. e Sato, Y. (1990). Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infect. Immun.* 58: 3369-3374.

24. Weiss, A.A. e Hewlett, E.L. (1986). Virulence factors of *Bordetella pertussis.* Ann. Rev. *Microbiol* 40: 661-668.

25. Munoz, J.J. (1988). Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system. In: *Pathogenesis and Immunity in Pertussis.* A.C. Wardlaw and R. Parton, eds., John Wiley & Sons Ltd., Toronto. pp. 211-229.

26. Watkins, P.A., Burns, D.L., Kanaho, Y., Liu, T-Y., Hewlett E.L., e Moss, J. (1985). ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 260: 13478-13482.

27. Burns, D.L., Kenimer, J.G., e Manclark, C.R. (1987). Role of the A subunit of periussis toxin in alteration of Chinese hamster ovary cell morphology. *Infect. Immun.*, 55: 24-28.

28. Munoz, J.J., Arai, H., e Cole, R.L. (1981). Mouse-protecting and histamine-sensitizing activities of pertussigen and fimbrial hemagglutinins from *Bordetella pertussis. Infect. Immun*. 32: 243-250.

29. Relman, D.A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., e Falkow, S. (1989). Filamentous haemagglutonin of Bordetella pertussis: nucleotide sequence and crucial role inadherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2637-2641.

30. Di Tommaso, A., Domenighini, M., Bugnoli, M., Tagliabuc, A., Rappuoli, R., e De Magistris, M.T. (1991). Identification of subregions of Bordetella pertussis filamentous haemagglutonin that stimulate human T-cell responses. *Infect. Immun. 59:* 3313-3315.

31. Tomoda, T., Ogura, H., e Kurashige, T. (1992). The longevity of the immune response to filamentous haemagglutonin and pertussis toxin in.patients with pertussis in a semiclosed community. *J. Infect. Dis.* 166: 908-910.

32. Edwards, K.M., Meade, B.D., Decker, M.D., Reed, G.F., Rennels, M.B., Steinhoff, M.C., Anderson, E.L., Englund, J.A., Pichichero, M.E., Deloria, M.A., Deforest, A., e the NIAID Acellular Pertussis Vaccine Study Group (1992). Comparison of thirteen acellular pertussis vaccines: serological response. *Pediatr. Res.* 31:91A.

33. Kimura, A., Mountzoutos, K.T., Relman, D.A., Falkow, S., e Cowell, J.L. (1990a). Bordetella pertussis filamentous haemagglutonin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect. Immun.* 58:7-16.

34. Shahin, R.D., Amsbaugh, D.F., e Leef, M.F. (1992). Mucosal immunization with filamentous haemagglutonin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.* 60: 1482-1488.

35. Montaraz, J.A., Novotny, P.. e Ivanyi, J. (1985). Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica. Infect. Immun.* 161: 581-582.

36. Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, M., Novotny, P., e Brennan, M.J (1991). Pertactin, and Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 88: 345-349.

37. De Magistris, T., Romano, M., Nuti, S., Rappuoli, R. e Tagliabue, A. (1988). Dissecting human T responses against Bordetella species *J. Exp. Med.* 168: 1351-1362.

38. Seddon, P.C., Novotny, P., Hall, C.A., e Smith, C.S. (1990). Systemic and mucosal antibody response to *Bordetella pertussis* antigens in children with whooping cough. *Serodiagnosis Immunother. Inf. Dis.* 3: 337-343.

39. Podda, A., Nencioni, L., Marsili, I., Peppoloni, S., Volpini, G., Donati, D., Di Tommaso, A., De Magistris, M.T., e Rappuoli, R. (1991). Phase I clinical trial of an acellular pertussis vaccine composed of genetically detoxified pertussis toxin combined with FHA and 69 kDa. Vaccine 9: 741-745.

40. Roberts, M., Tite, J.P., Fairweather, N.F., Dougan, G. e Charles, I.G. (1992). Recombinant P.69/pertactin: immunogenicity and protection of mice against *Bordetella pertussis* infection. *Vaccine* 10: 43-48.

41. Novotny, P., Chubb, A.P., Cownley, K., e Charles, I.G. (1991). Biological and protective properties of the 69kDa outer membrane protein of Bordetella *pertussis:* a novel

formulation for an acellular vaccine. *J. Infect. Dis.* 164: 114-122.

42. Shahin, R. D., Brennan, M.J., Li. Z.M., Meade, B.D., e Manclark, C.R. (1990b). Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis. J. Exp. Med.* 171: 63-73.

43. Robinson, A., Irons, L.I., e Ashworth, L.A.E. (1985a). Pertussis vaccine: present status and future prospects. *Vaccine* 3: 11-22.

44. Robinson, A., Ashworth, L.A.E. Baskerville, A., e Irons, L.I. (1985b). Protection against intranasal infection of mice with *Bordetella pertussis.* D*evelop. Biol. Stand.* 61: 165-172

45. Robinson, A., Gorrige, A.R., Funnell, S.G.P., e Fernandez, M. (1989b). Serospecific protection of mice against in infection with Bordetella pertussis. *Vaccine* 7: 321-324.

46. Sato, Y., Kimura, M., e Fukumi, H. (1984a). Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet i*: 122-126.

47. Kimura, M. (1991). Japanese clinical experiences with acellular pertussis vaccines. *Develop. Biol. Standard.* 73: 5-9.

48. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines (1988). Placebo-controlled trial of two acellular vaccines in Sweden-protective eficacy and adverse effects. *Lancet i* :955-960.

49. Olin, P., Storsaeter, J., e Romanus, V. (1989). The efficacy of acellular pertussis vaccine. *JAMA* 261:560.

50. Storsaeter, J., Hallander, H., Farrington, C.P., Olin, P., Moliby, R., e Miller, E. (1990). Secondary analyses of the efficacy of two acellular pertussis vaccines evaluated in a Swedish phase III trial. *Vaccine* 8: 457-462.

51. Storsaeter, J., e Olin, P. (1992). Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance. *Vaccine*: 10: 142-144.

52. Tan, L.U.T., Fahim R.E.F., Jackson, G., Phillips, K., Wah, P., Alkema, D., Zobrist, G., Herbert, A., Boux. L, Chong, P., Harjee, N., Klein, M., e Vose, J. (1991). A novel process for preparing an acellular pertussis vaccine composed of non-pyrogenic toxoids of pertussis toxin and filamentous haemagglutonin. *Molec. Immunol.* 28: 251-255.

53. Sekura, R.D., Zhang, Y., Roberson, R., Acton, B., Trollfors, B,. Tolson, N., Siloach, J., Bryla, D., Muir-Nash, J., Koeller, D., Schneerson, R., e Robbins, J.B. (1988). Clinical, metabolic, and antibody responses of adult volunteers to an investigation vaccine composed of pertussis toxin inactivated by hydrogen peroxide. *J. Pediatr.* 113: 807-813.

54. Winberry, L., Walker, R., Cohen, N., Todd, C., Sentissi, A., e Siber, G. (1988), Evaluation of a new method for inactivating pertussis toxin with tetranitromethane. *International Workshop on Bordetella pertussis,* Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana.

55. Sekura, R.D. *et al.* (1993), *J.Biol. Chem.* 258: 14647-14651.

56. Irons, L.I. *et al.* (1979), *Biochem. Biophys. Acta* 580: 175-185.

57. Munoz, J.J. *et al.* (1981). *Infect. Immun.* 33: 820-826.

58. Cowell, J.L. *et al.* (1980), Seminar on *Infectious* Diseases 4: 371-379.

59. Selmer, J.C. (1984) *Acta Path. Microbial. Immunol. Scand. Sect.* C, 92: 279-284.

60. Lockhoff, O. (1991) Glycolipids as Immunomodulators: Synthesis and Properties, *Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 1611-1620.

61. Nixon-George, A., Moran, T., Dionne, G., Penney, C.L., Lafleur, D., Bona, C.A. (1990) The adjuvant effect of stearyl tyrosine on a recombinant subunit hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 144: 4798-4802.

62. Siber, G.R., Thakrar, N., Yancey, B.A., Herzog. L., Todd, C., Cohen, N., Sekura, R.D., Lowe, C.U. (1991). Safety and immunogenicity of hydrogen peroxide-inactivated pertussis toxoid in 18-month-old children. *Vaccine* 9: 735-740.

63. Siber, G., Winberry, L., Todd, C., Samore, M., Sentissi, A., e Cohen, N. (1988). Safety and immunogenicity in adults of pertussis toxoid inactivated with tetronitromethane. In: *International Workshop on Bordetella pertussis,* Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana.

64. Edwards, K.M., Bradley, R.B., Decker, M.D., Palmer, P.S., Van Savage, J., Taylor, J.C., Dupont, W.D., Hager, C.C., e Wright, P.F. (1989). Evaluation of a new highly purified pertussis vaccine in infants and children. J. *Infect. Dis.* 160: 832-837.

65. Rutter, D.A., Ashworth, L.A.E., Day, A., Funnell, S., Lovell, F., e Robinson, A. (1988). Trial of new acellular pertussis vaccine in healthy adult volunteers. *Vaccine* 6: 29-32.

66. Blumberg, D.A., Mink, C.A.M, Cherry, J.D., Johnson, C., Garber, R., Plotkin, S.A.. Watson, B., Ballanco, G.A., Daum R.S., Sullivan B., Townsend, T.R. Brayton, J., Gooch, W.M., Nelson, D.B., Congeni, B.L., Prober, C.G., Hackell, J.G., Dekker, C.L., Christenson, P.D., e the APDT Vaccine Study Group (1991). Comparison of acellular and whole cell pertussis-component diphtheria-tetanus-pertussis vaccines in infants. *J. Pediatr.* 119: 194-204.

67. Englund, J.A., Glezen, W.P. e Barreto, L. (1992a). Controlled study of a new five-component acellular pertussis vaccine in adults in young children. *J. Inf. Dis.* 166: 1436-1441.

68. Zealey, G., Loosmore, S., Yacoob, R., Klein, M., Vaccine Research, Vol. 1, pp. 413-427.

69. Baker JD, Halperin SA, Edwards K, Miller B. Decker M, Stephens D. Antibody response to *Bordetella* pertussis antigens after immunization with American and Canadian whole cell vaccines *J. pediatr.* 1992, 121:523-527.

70. Halperin SA. Eastwood BJ. Langley JM. Immune responses to pertussis vaccines concurrently administered with viral vaccines. Ann NY Acad Sci. 1995, 754: 89-96.

71. Halperin SA, Langley JM. Eastwood BJ. Effect of inactivated poliovirus vaccine on the antibody response to Bordetella pertussis antigens when combined with diphtheria-pertussis-tetanus vaccine. Clin. Infect. Dis. 1996; in press

72. Ferreccio C., Clemens J. Avendano A. *et al*. The clinical and immunogenic response of Chilean infants to Haemophilus influenzae type b polysaccharide tetanus protein conjugate vaccine coadministered in the same syringe with diptheria-tetanus toxoide-pertussis vaccine at two, four and six months of age. Pediatr. Infect. Dis. J. 1991; 10:761-771.

73. Clemens J. Ferreccio C., Levine M. *et al*. Impact of Haemophilus influenzae typ b polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine on responses to concurrently administered diphetheriatetanus pertussis vaccine. JAMA 1992; 267:673-8.

74. Scheifele D. Barreto L. Meekison W. *et al*. Can Haemophilus influenaze vaccine be combined with diptheria and tetanus toxoids. Can Med Assoc. J. 1993; 149: 1105-16.

75. Gold R., Scheifele D., Barreto L. *et al*. Safety and immunogeniciy of Haemophilus influnzae vaccine (tetanus toxoid conjugate) administered concurrently or combined with diptheria and tetanus toxoids, pertussis vaccine and inactivated poliomyelitis vaccine to healty infants at two, four and six months of age. Pediatr. Infect. Dis J. 1994; 13: 348-55.

76. Shinefield H. Black S, Ray P, Lewis E. Fireman B., Hohenboken, hackell JG. Safety of combined acellular pertussis vaccine in infants [abstract no G72]. In: program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobiols and Chemotherapy. Washington, DC; American Society of Microbiology 1995: 171.

77. Greenberg DP, Wong VK, Partridge S, Howe BJ, Fing J. Ward JL. Evaluation of a new combination vaccine that incorporates diptheria-tetanus-acellular pertussis, hepatitis b, and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines

[Abstract no G70] In program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobiols and Chemotherapy. Washington, DC; American Society of Microbiology 1995: 170.

78. Wassilak SGF, Orenstein WA, Tetanus, In Plotkin SA, Mortimer EA, Jr., eds, Vaccines, WB Saunders Company, Philadelphia, 1988; 45-73.

79. Gustaffson *et al*, New England J. Medicine, 1996, vol. 334. Pp 349-355.

80. Mortimer EA Jr., Diphtheria Toxoid, In Plotkin SA, Mortimer EA, Jr., eds, Vaccines, WB Saunders Company, Philadelphia, 1988; 31-44.

81. Varughese P: *Haemophilus Influenzae* infection in Canada, 1969-1985. Can Dis Wkly Rep 1986; 12:37-43.

82. Schelfele D, Gold R, Law B, *et al*: Decline in *Haemophilus Influenzae* type b invasive infections at five Canadian pediatric centres. Can Commun Dis Rep 1993; 19:88-91

83. Scheifele D., Barreto L., Meekison W. *et al*.: Can *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine be combined with diphtheria toxoid-pertussis vaccine-tetanus toxoid? Can Med Assoc J 1993,149: 1105-1112

84. Gold R, Scheifele D, Barreto L *et al*.: Safety and Immunogenicity of *Haemophilus Influenzae* type b vaccine (tetanus toxoid conjugate) administered concurrently or combined with diphtheria and tetanus toxoids, pertussis vaccine and inactivated poliomyelitis vaccines to healthy infants at two, four and six months of age. Pediatric Infectious Diseases Journal 1994; 13:348-55

85. Scheifele D, Gold R *et al*. Canada Communicable Disease Report 22-3, F1-F3 Feb 1, 1996.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogénica multivalente para conferir protecção num hospedeiro contra doença causada por infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* e poliovírus, incluindo a composição:

(a) toxóide de *pertussis*, hemaglutinina filamentosa, pertactina e aglutinogénios em forma purificada,

(b) toxóide de tétano,

(c) toxóide de difteria e

(d) poliovírus inactivado,

que é formulada como uma vacina para administração *in vivo* a um hospedeiro e em que para cada dose humana única o referido toxóide de *pertussis* se encontra presente numa quantidade de 5 a 30 μg de azoto, a referida hemaglutinina filamentosa se encontra presente numa quantidade de 5 a 30 μg de azoto, a referida pertactina se encontra presente numa quantidade de 3 a 15 μg de azoto e os referidos aglutinogénios se encontram presentes numa quantidade de 1 a 10 μg de azoto.

2. Composição tal como reivindicada na reivindicação 1 incluindo um adjuvante.

3. Composição tal como reivindicada na reivindicação 2 em que o adjuvante é hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio.

4. Composição tal como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e contendo 20 μg de azoto de toxóide de *pertussis*, 20 μg de azoto de hemaglutinina filamentosa, 5 μg de azoto de pertactina e 3 μg de azoto de aglutinogénios, numa dose humana única.

5. Composição tal como reivindicada na reivindicação 1 em que o referido toxóide de difteria se encontra presente numa quantidade de 10 a 20 Lf e o referido toxóide de tétano se encontra presente numa quantidade de 1 a 10 Lf.

6. Composição tal como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 em que o referido toxóide de difteria se

encontra presente numa quantidade de 15 Lf e o toxóide de tétano se encontra presente numa quantidade de 5 Lf.

7. Composição tal como reivindicada em qualquer reivindicação anterior em que o referido poliovírus inactivado inclui uma mistura de poliovírus do tipo 1, 2 e 3 inactivados.

8. Composição tal como reivindicada na reivindicação 7 em que a referida mistura de poliovírus do tipo 1, 2 e 3 inactivados se encontra presente nas proporções:
20 a 50 unidades de antigénio D de poliovírus do tipo 1
5 a 10 unidades de antigénio D de poliovírus do tipo 2
20 a 50 unidades de antigénio D de poliovírus do tipo 3, numa dose humana única.

9. Composição tal como reivindicada na reivindicação 8 em que a referida mistura de poliovírus do tipo 1, 2 e 3 inactivados se utiliza nas proporções:

40 unidades de antigénio D de poliovírus do tipo 1
8 unidades de antigénio D de poliovírus do tipo 2
32 unidades de antigénio D de poliovírus do tipo 3, numa dose humana única.

10. Composição tal como reivindicada em qualquer das reivindicações anteriores que confere adicionalmente, em utilização, protecção contra doença causada por infecção por *Haemophilus influenzae*, em que a referida composição inclui um conjugado de uma molécula transportadora seleccionada entre toxóide de tétano e toxóide de difteria e um polissacárido de cápside de *Haemophilus influenzae* tipo b.

11. Composição tal como reivindicada na reivindicação 10 em que o referido conjugado inclui um conjugado de toxóide de tétano ou toxóide de difteria e polirribose-ribitolfosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b.

12. Composição tal como reivindicada na reivindicação 10 ou na reivindicação 11 em que o referido conjugado é proporcionado sob uma forma liofilizada e é reconstituído para administração na referida composição imunogénica pelos componentes da composição.

13. Composição tal como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 10 a 12 em que a referida composição imunogénica contém o conjugado numa quantidade de 5 a 15 μg de PRP conjugado a 15 a 35 μg de toxóide de tétano, numa dose humana única.

14. Composição tal como reivindicada na reivindicação 13 em que a referida composição imunogénica contém o conjugado numa quantidade de 10 μg de PRP conjugado a 20 μg de toxóide de tétano, numa dose humana única.

15. Composição de vacina multivalente tal como reivindicada na reivindicação 1 e incluindo, por dose de 0,5 ml, o seguinte:
20 μg de toxóide de *pertussis*
20 μg de hemaglutinina filamentosa
5 μg de fímbrias 2 e 3
3 μg de proteína membranar de pertactina
15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano
40 unidades de antigénio D de poliovírus de tipo 1
8 unidades de antigénio D de poliovírus de tipo 2
1,5 μg de fosfato de alumínio.

16. Composição tal como reivindicado na reivindicação 15 e incluindo, por dose de 0,5 ml, o seguinte:
10 μg de polissacárido de cápside polirribose-ribitolfosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b purificado, ligado covalentemente a 20 μg de toxóide de tétano.

17. Composição tal como reivindicada na reivindicação 15 ou 16 e incluindo, por dose de 0,5 ml, o seguinte:
2-fenoxietanol a 0,6%.

18. Composição de qualquer das reivindicações anteriores para utilização como medicamento.

19. Composição tal como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 para utilização no fabrico de um medicamento para imunizar um hospedeiro contra doença.

Lisboa,

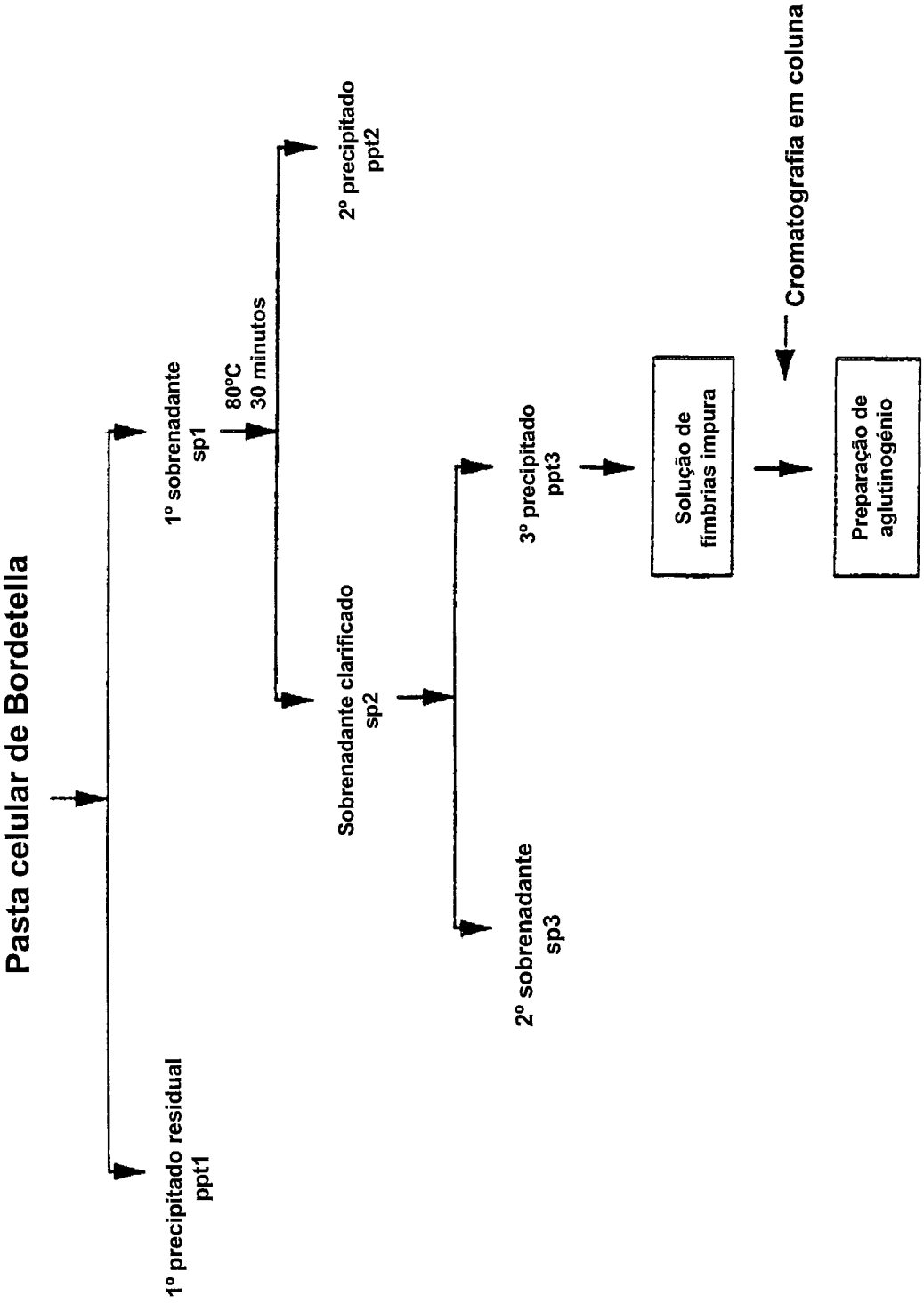
Pasta celular de Bordetella
1º precipitado residual ppt1
1º sobrenadante sp1
80ºC 30 minutos
2º precipitado ppt2
Sobrenadante clarificado sp2
2º sobrenadante sp3
3º precipitado ppt3
Solução de fímbrias impura
Cromatografia em coluna
Preparação de aglutinogénio

Figura 1