



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9710460-4 B1



(22) Data do Depósito: 02/07/1997

(45) Data de Concessão: 05/02/2019

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA MULTI-VALENTE E COMPOSIÇÃO DE VACINA

(51) Int.Cl.: A61K 39/295.

(30) Prioridade Unionista: 02/07/1996 US 08/672,530.

(73) Titular(es): AVENTIS PASTEUR LIMITED.

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

(86) Pedido PCT: PCT CA1997000472 de 02/07/1997

(87) Publicação PCT: WO 1998/000167 de 08/01/1998

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/12/1998

(57) Resumo: "Composição imunológica multi-valente e seu uso em vacinas". Composição de vacina multi-componente é descrita compreendendo componentes de vacina para coqueluche acelular, toxóide de difteria, toxóide de tétano, e polio vírus inativado. A composição também pode conter um conjugado de um polissacarídeo capsulado de Haemophilus influenzae tipo b e toxóide de tétano, cujo qual pode ser reconstituído de um estado liofilização por outros componentes da vacina. A administração da vacina multi componente resulta não ocasiona diminuição da imunogenicidade de qualquer componente como uma resultante da interferência por outros componentes da vacina.

**COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA MULTI-VALENTE E COMPOSIÇÃO DE VACINA
CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a vacinas multivalentes, particularmente para administração pediátrica.

5 **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

A Coqueluche é uma infecção do trato respiratório superior, grave e altamente contagiosa causada por *Bordetella pertussis*. A Organização Mundial da Saúde calcula que há 60 milhões de casos de coqueluche por ano e
10 0,5 a 1 milhão de mortes associadas. Em populações não vacinadas, uma taxa de incidência de coqueluche tão elevada quanto 80% foi observada em crianças com menos de 5 anos de idade. Embora coqueluche seja geralmente considerada uma
15 clínica e assintomática em adolescentes e adultos. A introdução de vacinas de célula integral compostas de organismos *B.pertussis* inativados química e termicamente na década de 40 foi responsável por uma redução acentuada na incidência de coqueluche ocasionada por *B. coqueluche*. As
20 taxas de eficácia para vacinas de célula integral foram calculadas ate 95% dependendo da definição do caso. Embora a infecção com *B.pertussis* confira imunidade por toda vida, há evidência crescente de proteção diminuída após imunização com vacinas de célula integral. Vários
25 relatórios citando uma relação entre vacinação de coqueluche de célula integral, reatogenicidade e efeitos colaterais sérios conduziram a um declínio em aceitação de vacina e epidemia repetida consequente. Mais recentemente, foram

29

desenvolvidas vacinas de coqueluche com componente definido.

Antígenos para Vacinas de Pertussis definida

Várias vacinas de coqueluche acelar foram desenvolvidas e incluem os antígenos de *Bordetella pertussis*, toxina de Coqueluche (PT), Hemaglutinina Filamentosa (FHA), a proteína de membrana externa de 69 kDa (pertactina) e aglutinógenos fimbriais (Tabela 1).

Toxina de Coqueluche

A toxina da Coqueluche é uma exotoxina que é um membro da família A/B de toxinas bacterianas com atividade ADP-ribosiltransferase. A fração-A destas toxinas apresenta a atividade ADP-ribosiltransferase e a porção B media a ligação da toxina a receptores de célula hospedeira e a translocação de A para seu sítio de ação. PT também facilita a aderência de *B. pertussis* a células epiteliais ciliadas e também desempenha um papel na invasão de macrófagos por *B. pertussis*.

Todas as vacinas acelulares de coqueluche incluíram PT, que foi proposto com um principal fator de virulência e antígeno de proteção. A infecção natural com *B. pertussis* gera respostas tanto mediadas por célula como humoral à PT. As crianças têm anticorpos anti-PT transplacentalmente derivadas e colostro humano contendo anticorpos anti-PT foram eficazes na proteção passiva de camundongos contra aerossol infectado. Uma resposta imune mediada por célula (CMI) a subunidades PT foi demonstrada após imunização com uma vacina acelar e uma resposta CMI a PT foi gerada após

32

vacinação de célula integral. PT quimicamente inativado em vacinas de componente ou célula integral é protetor em modelos animais e em seres humanos. Além disso, anticorpos monoclonais específicos para subunidade S1 protegem contra infecção por *B.pertussis*.

Os efeitos patofisiológicos de PT são devidos a sua atividade ADP-ribosiltransferase. PT catalisa a transferência de ADP-ribose de NAD para a proteína de ligação por nucleotídeo guanina G_i , desse modo rompendo o sistema regulador de ciclase adenilato celular. PT também evita a migração de macrófagos e linfócitos para sítios de inflamação e interfere com fagocitose mediada por neutrófilo e extermínio de bactérias. Diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram utilizados para avaliar a atividade enzimática de S1 e/ou PT, incluindo a ADB-ribosilação de transducina bovina, o ensaio de agrupamento de células de ovário de hamster Chinês (CH), sensibilização de histamina, leucocitose, e NAD glicohidrolase. Quando expostas a PT, as células CHO desenvolvem uma morfologia agrupada característica. Este fenômeno depende da ligação de PT, e subsequente translocação e atividade de ADP-ribosiltransferase de S1 e desse modo o ensaio de agrupamento de célula CHO é amplamente utilizado para testar a integridade e toxicidade de holotoxinas PT.

Hemaglutinina filamentosa

Hemaglutinina filamentosa é um polipeptídeo não tóxico (220 kDa) que media a ligação de *B.pertussis* a células ciliadas do trato respiratório superior durante colonização

bacteriana. A infecção natural induz anticorpos anti-FHA e imunidade mediada por célula. Anticorpos anti-FHA são encontrados em colostro humano e também são transmitidos transplacentalmente. A vacinação com vacinas acelulares ou de célula integral de coqueluche gera anticorpos anti-FHA e vacinas acelulares contendo FHA também induzem uma resposta CMI a FHA. FHA é um antígeno de proteção em um modelo de infestação respiratória de camundongo após imunização ativa ou passiva. Contudo, FHA sozinho não protege no ensaio de potência de infestação intracerebral de camundongo.

Proteína de membrana externa de 69 kDa (Pertactina)

A proteína de 69 kDa é uma proteína de membrana externa que foi originalmente identificada por *B.bronchiseptica*. A proteína também é conhecida como pertactina e P.69. Foi mostrada como sendo um antígeno de proteção contra *B.bronchiseptica* e foi subsequenteemente identificada tanto em *B.pertussis* como *B.perapertussis*. A proteína de 69 kDa se liga diretamente a células eucarióticas e a infecção natural por *B.pertussis* induz uma resposta humoral anti-P.69 e P.69 também induz uma resposta imune mediada por célula. A vacinação com vacinas acelulares ou de célula integral induz anticorpos anti-P.69 e vacinas acelulares induzem P.69 CMI. Pertactina protege os camundongos contra infestação por aerossol com *B.pertussis*. e em combinação com FHA, protege no teste de infestação intracerebral contra *B.pertussis*. A transferência passiva de anticorpos anti-P.69 policlonal ou monoclonal também protege camundongos contra infestação por

aerossol.

Aglutinógenos

Serotipos de *B.pertussis* são definidos por suas fímbrias de aglutinação. A Organização Mundial de Saúde recomenda que vacinas de célula integral incluam aglutinógenos dos tipos 1, 2 e 3 (Aggs) uma vez que não são de proteção cruzada. Agg 1 é não fimbrial e é encontrado em todas as cepas de *B.pertussis* enquanto os Aggs de serotipo 2 e 3 são fimbriais. A infecção natural ou imunização com vacinas acelulares ou de célula integral induz anticorpos anti-Agg. Uma resposta imune mediada por célula específica pode ser gerada em camundongos por Agg 2 e Agg 3 após infecção por aerossol. Aggs 2 e 3 são protetores em camundongos contra infestação respiratória e colostro humano contendo anti-aglutinógenos também protegerão neste ensaio.

Vacinas acelulares para Coqueluche

A primeira vacina acelular para coqueluche desenvolvida foi a vacina PT + FHA de dois componentes (JNH 6) de Sato e outros. Esta vacina foi preparada por co-purificação de antígenos FHA e PT do sobrenadante de cultura da cepa *B.pertussis* Tohama, seguido por formação de toxóide de formalina. Vacinas acelulares de vários fabricantes e de várias composições foram utilizadas com sucesso para imunizar crianças japonesas contra coqueluche desde 1981 resultando em uma redução acentuada na incidência da doença. A vacina JNH 6 e uma vacina de toxóide PT de mono-componente (JNH 7) foram testadas em um

23/6

grande experimento clínico na Suécia em 1986. Os resultados iniciais indicaram eficácia mais baixa do que a eficácia relatada de uma vacina de célula integral, porém estudos de acompanhamento mostraram a mesma como sendo mais eficaz contra doença mais branda diagnosticada por métodos sorológicos. Contudo, houve evidência de reversão da toxicidade de PT inativado-formalina nestas vacinas. Verificou-se também que estas vacinas são capazes de proteger contra a doença ao invés da infecção.

Diversas vacinas novas de coqueluche de componente e acelulares estão atualmente sendo avaliadas, as quais incluem combinações de PT, FHA, P.69, e/ou aglutinógenos e estas estão relacionadas na Tabela 1. Várias técnicas de desintoxicação química foram utilizadas para PT incluindo inativação com formalina, glutaraldeído, peróxido de hidrogênio e tetranitrometano.

Tétano

O Tétano é uma infecção aguda causada por *Clostridium tetani*. A doença é caracterizada por contrações musculares dolorosas, severas, acompanhadas por hipersensibilidade, hiper-reflexia e estimulação autonômica aumentada da(s) parte(s) do corpo afetada(s). Os estímulos brandos podem ocasionar espasmos musculares de reflexo severos. A febre devido a espasmo muscular extremo pode estar presente. O Tétano pode ser generalizado, envolvendo o rosto, pescoço, abdômen e tronco, ou localizada em uma parte específica do corpo (local do ferimento). O envolvimento do músculo masseter do rosto resulta em trismo, dando origem à

expressão facial clássica conhecida como "risus sardonicus".

5 *C. tetani* existe como um organismo não patogênico no intestino de seres humanos e animais. O organismo também é encontrado em solo contaminado por fezes e pode sobreviver em solo por anos como esporos infecciosos.

10 O tétano resulta do crescimento anaeróbico de *C. tetani* e produção de neurotoxina em ferimentos contaminados. A infecção é causada pela introdução de materiais contaminados por organismos ou esporos no tecido. O cenário mais comum é infecção através de um ferimento penetrante. Contudo, em muitos casos nenhum histórico de ferimento é obtível. A presença de tecido isquêmico ou necrótico facilita o crescimento do bacilo.

15 A prevenção de infecção é por vacinação e por boa higiene de ferimento incluindo limpeza cuidadosa e debridamento de tecidos desvitalizados. As pessoas com ferimentos contaminados devem receber tanto a vacina de tétano como a imunoglobulina de tétano.

20 O tratamento da síndrome é principalmente de apoio e pode incluir apoio respiratório, administração de antitoxina de tétano e limpeza cuidadosa de ferimentos infectados. Apesar de cuidados médicos modernos as taxas de fatalidade de caso ainda são tão elevadas quanto 30 a 90%.
25 Isto é particularmente verdadeiro nos idosos. A infecção natural nem sempre produz imunidade contra infecção adicional.

A prevenção de infecção por vacinação é o método mais

eficaz para controlar a doença. Desde a introdução de vacinação universal, o tétano se tornou extremamente raro em países desenvolvidos. Os casos ocorrem quase exclusivamente em pessoas que deixaram de completar sua série de vacinações ou que não receberam doses de reforço apropriadas. As pessoas devem receber uma dose de reforço uma vez a cada dez anos.

Difteria

Difteria é uma infecção aguda causada pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae*. O sítio principal de infecção é o trato respiratório superior (nariz, faringe, laringe e traquéia. A lesão característica, um resultado da citotoxina bacteriana, são placas de pseudomembrana cinzenta circundados por inflamação. Esta é acompanhada por linfadenopatia cervical, inchaço e edema da garganta. Em casos graves o inchaço pode progredir até o ponto de obstrução (difteria laríngea). Outras complicações incluem miocardite, efeitos do sistema nervoso central (neuropatias sensórias, de motor e cranial, como paralisia ascendente), e trombocitopenia. Outras membranas de mucosa podem ser menos freqüentemente afetadas. A apresentação clínica pode variar de infecção assintomática para multi-sistema fulminante, e morte. Infecções cutâneas e de ferimento com difteria são comuns nos trópicos e foram freqüentemente reportados na população indigente dos E.U.A. O único reservatório de *C. diphtheriae* é o homem.

Um diagnóstico presumível pode ser feito em observação clínica das lesões características porém deve ser

36

confirmado por exame bacteriano das lesões. Caso haja uma forte suspeita clínica de difteria, o tratamento deve ser iniciado imediatamente com antibióticos (penicilina ou eritromicina) e antitoxina de difteria, mesmo se o diagnóstico não for confirmado. A mortalidade aumenta quanto mais tempo se espera após o início de sintomas clínicos. A taxa de fatalidade de caso varia de cinco a dez por cento apesar do tratamento médico moderno e ocorre principalmente nos muito jovens e nos idosos. A infecção natural nem sempre produz imunidade contra infecção adicional.

A transmissão é por contato direto com secreções uma pessoa infectada. As pessoas são contagiosas enquanto bactérias são observadas nas secreções. Isto pode durar até quatro semanas após a infecção. A transmissão pode ocorrer também com fomitos infectados. O isolamento rigoroso de casos é recomendado.

Raramente as pessoas podem se tornar portadoras e espalhar organismos até seis meses após a infecção. Portadores não imunizados devem ser imediatamente vacinados com a série total. O tratamento com antibióticos elimina transporte e capacidade de infecção de casos em 4 dias.

Poliomielite

Vacinas de poliovírus tanto inativadas (IPV) como atenuadas vivas (OPV) foram eficazes no controle de poliomielite no mundo inteiro. Uma vacina DPT-IPV combinada é atualmente licenciada na Europa e no Canadá e tem sido mostrada como segura e eficaz em milhões de crianças no

37
H

mundo inteiro.

Haemophilus influenzae do tipo b

Antes da disponibilidade de vacinas eficazes, *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) era causa principal de infecções invasivas de meningite carregadas pelo sangue em crianças pequenas e era a principal causa de meningite nos 2 primeiros anos de vida. Aproximadamente 10% de vítimas de meningite por *Haemophilus influenzae* morrem apesar do tratamento médico. Sequelas permanentes são comuns em sobreviventes. A imunização contra *Haemophilus influenzae* começou no Canadá em 1987 com uma vacina de polissacarídeo (polirribose ribitol fosfato [PRP] de *Haemophilus influenzae* tipo b). A imunogenicidade aperfeiçoada foi obtida em crianças de 18 meses de idade e mais velhas com a introdução em 1988 de uma vacina consistindo em PRP conjugado com toxóide de difteria (PRP-D). Desde 1992, a imunização de crianças tem sido possível com a liberação de vacinas conjugadas de PRP imunogênicas em bebês com menos de 1 ano de idade (PRP conjugado com toxóide de tétano ou PRP-T). O uso destas vacinas conjugadas de *Haemophilus influenzae* foi associado a uma redução acentuada na incidência de infecção de difteria invasiva no Canadá e em outros lugares. Dois estudos clínicos canadenses envolvendo quase 900 crianças em British Columbia e Alberta demonstram que PRP-T liofilizado pode ser reconstituído com DPT (COMBIPACK ou com DPT-Polio Adsorbed (PENTA™) além do diluente de solução salina usual. Estudos clínicos envolvendo mais de 100.000 crianças em todo o mundo

demonstraram a eficácia de PRP-T liofilizado (ActHib™). Mais de 90% obtêm níveis anti-PRP considerados como de proteção ($\geq 0,15$ ug/ml) após 3 doses de PRP-T iniciando com 2 meses ou após uma única dose de PRP-T dados após 12 meses de idade. A proporção obtendo níveis indicativos de proteção a longo prazo ($>1,0$ ug/ml) varia de 70 a 100% dependendo do estudo. Milhões de doses de PRP-T foram vendidas no Canadá desde 1992. Casos de alastramento da infecção invasiva por *Haemophilus* após vacinação com PRP-T são raros e podem ser associados a doenças como imunodeficiência.

Combinação de vacinas

Embora haja muitos benefícios efetivos e potenciais de vacinas que combinem antígenos para conferir proteção contra múltiplos patógenos, estas combinações podem ter um efeito prejudicial sobre a imunogenicidade dos componentes individuais. As combinações de toxóide de tétano e difteria com vacina de coqueluche de célula integral (DTP) estão disponíveis há mais de 50 anos e a resposta de anticorpo à combinação é superior àquela dos componentes individuais, talvez como resultado de um efeito adjuvante da vacina de coqueluche de célula integral. Combinações DTP que também incluem vacina de poliovírus inativado são licenciadas em muitas jurisdições, embora a resposta de anticorpo aos antígenos de coqueluche possa ser diminuída por esta combinação. O efeito de combinar vacinas DTP com vacina conjugada Hib tem sido variável. Os estudos com um DTP francês e PRPT demonstraram segurança similar porém uma

duplex
bitar
coque

۱۰

20

o PT, FHA e 69K e contendo
 storia di
 Coagulante
 peractina

PT, FHA, 69K e fímbrias.

A vacina APDT de cinco componentes examinada neste estudo foi verificada ter uma eficácia de proteção de 85% (Exemplo 5) (95% CI 81/89) em um experimento clínico de fase III recentemente concluído na Suécia sob os auspícios do National Institutes of Health.

Vacinas de combinação comercialmente disponíveis atuais podem não conter formulações apropriadas de antígenos apropriados em formas imunogênicas apropriadas para obter um nível desejado de eficácia em uma população humana suscetível a coqueluche.

Seria desejável fornecer vacinas de combinação eficazes compreendendo componentes de coqueluche acelulares contendo quantidades relativas selecionadas de antígenos selecionados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida à vacinas de combinação ou multivalentes contendo componentes de vacina de coqueluche acelular, e métodos de uso das mesmas.

De acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecida uma composição imunogênica multivalente para conferir proteção em um hospedeiro contra doença causada por infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, poliovírus e/ou *Haemophilus influenzae*, compreendendo:

a) toxóide de coqueluche, hemaglutinina filamentosa, pertactina e aglutinógenos em forma purificada,

- b) toxóide de tétano,
c) toxóide de difteria,
d) vírus de pólio inativado, e opcionalmente,
e) um conjugado de uma molécula portadora

5 selecionada dentre toxóide de tétano e toxóide de difteria e um polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.

10 A composição imunogênica pode ser formulada como uma vacina para administração *in vivo* ao hospedeiro em que os componentes individuais a composição são formulados de tal modo que a imunogenicidade de componentes individuais não é prejudicada por outros componentes individuais da composição.

15 A composição imunogênica pode compreender ainda um adjuvante, particularmente hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio.

20 Tal composição imunogênica pode conter aproximadamente 5 a aproximadamente 30 ug de nitrogênio de toxóide de coqueluche, aproximadamente 5 a 30 ug de nitrogênio de hemaglutinina filamentosa, aproximadamente 3 a aproximadamente 15 ug de nitrogênio de pertactina e aproximadamente 1 a aproximadamente 10 ug de nitrogênio de aglutinógenos.

25 Em uma modalidade específica, a composição imunogênica pode compreender toxóide de coqueluche, hemaglutinina fimbrial, a proteína 69 kDa e aglutinógenos filamentosos de *Bordetella pertussis* a uma razão de peso de aproximadamente 20:20:5:3 como fornecido por aproximadamente 20 ug de

42
B

toxóide de coqueluche, aproximadamente 20 ug de
hemaglutinina filamentosa, aproximadamente 5 ug de
aglutinógenos fimbriais e aproximadamente 3 ug de proteína
69 kDa em uma dose humana única. Em outra modalidade
5 específica, a vacina pode compreender toxóide de
coqueluche, hemaglutinina filamentosa, a proteína de 69 kDa
e aglutinógeno fimbrial de *Bordetella pertussis* a uma razão
de peso de 10:5:5:3 como fornecido por aproximadamente 10
ug de toxóide de coqueluche, aproximadamente 5 ug de
10 hemaglutinina filamentosa, aproximadamente 5 ug de
aglutinógeno fimbrial e aproximadamente 3 ug de proteína 69
kDa em uma dose humana única. Em uma modalidade da
composição imunogênica fornecida aqui, a vacina contém
aproximadamente 15 Lfs de toxóide de difteria e
15 aproximadamente 5 Lfs de toxóide de tétano.

O poliovírus inativado empregado na composição
imunogênica da invenção compreende geralmente uma mistura
de poliovírus inativado dos tipos 1, 2 e 3. Tal mistura de
poliovírus inativado tipos 1, 2 e 3 pode ser empregada nas
20 composições:

aproximadamente 20 a aproximadamente 50 D unidades de ✓
antígeno de poliovírus do tipo 1;

aproximadamente 5 a aproximadamente 10 D unidades de ✓
antígeno de poliovírus do tipo 2;

25 aproximadamente 20 a aproximadamente 50 D unidades de ✓
antígeno de poliovírus do tipo 3

em uma dose humana única. Em uma formulação, tais
misturas de tipos de poliovírus inativados podem

63/

compreender:

aproximadamente 40 D unidades de antígeno de poliovírus tipo 1;

5 aproximadamente 8 D unidades de antígeno de poliovírus tipo 2;

aproximadamente 32 D unidades de antígeno de poliovírus tipo 3 em uma dose humana única.

O componente de molécula conjugada da composição imunogênica pode compreender um conjugado de toxóide de tétano ou toxóide de difteria e polirribose ribitol fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b. Tal molécula de conjugado pode ser fornecida em uma forma liofilizada, que é reconstituída para administração por combinação com os outros componentes. A composição imunogênica pode conter o conjugado em uma quantidade de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 ug de PRP conjugado com aproximadamente 15 a aproximadamente 35 ug de toxóide de tétano, em uma dose humana única. Em uma formulação, o conjugado é empregado em uma quantidade de aproximadamente 10 ug de PRP conjugado com aproximadamente 20 ug de toxóide de tétano.

Em tais modalidades específicas, as composições imunogênicas fornecem um perfil de resposta imune a cada um dos antígenos de coqueluche contidos na mesma e o perfil de resposta fornecido pelos componentes acelulares é substancialmente equivalente àquele produzido por uma vacina de coqueluche de célula integral.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, é fornecida uma composição de vacina multivalente,

compreendendo, por dose de 0,5 ml, 20 ug de toxóide de coqueluche, 20 ug de hemaglutinina filamentosa; 5 ug de fímbrias 2 e 3; 3 ug de proteína de membrana de pertactina; 15 Lf de toxóide de difteria; 5 Lf de toxóide de tétano; poliovírus do tipo 1 40 D unidades de antígeno; poliovírus tipo 2 8 D unidades de antígeno; 1,5 ug de fosfato de alumínio.

Tal composição pode compreender ainda, por dose de 0,5 ml, 10 ug de polissacarídeo capsular de fosfato ribitol poliribose purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b covalentemente ligado a 2 ug de toxóide de tétano. Além disso, tais composições podem conter, por dose de 0,5 ml, 0,6% 2-fenoxietanol.

Em um aspecto adicional da invenção, é fornecido um método de imunizar um hospedeiro contra múltiplas doenças, compreendendo administrar ao hospedeiro, que pode ser humano, uma quantidade imunoeficaz da composição imunogênica ou vacina como fornecido aqui.

As vantagens da presente invenção incluem uma vacina multivalente que pode conferir proteção contra uma gama de doenças pediátricas comuns em um modo seguro e eficaz. A capacidade de fornecer uma vacinação única contra múltiplas doenças sem interferência entre as respostas imunogênicas aos vários imunógenos é benéfica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A presente invenção será entendida adicionalmente da seguinte descrição detalhada e Exemplos com referência ao desenho em anexo, no qual:

65
H

A Figura 1 é um fluxograma esquemático de um procedimento para o isolamento de uma preparação de aglutinógeno de uma cepa de *Bordetella*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 Preparação de aglutinógeno

Com referência à Figura 1, é ilustrado um fluxograma de um método para preparar uma preparação de aglutinógeno de uma cepa de *Bordetella*. Como visto na Figura 1, uma pasta de célula de *Bordetella* contendo os aglutinógenos, como pasta de célula *B.pertussis*, é extraída, por exemplo, com um tampão contendo uréia, como 10 mM de fosfato de potássio, 150 mM NaCl e 4M de uréia, para extrair seletivamente os aglutinógenos da pasta de célula para produzir um primeiro sobrenadante (sp1) contendo aglutinógenos e um primeiro precipitado residual (ppt1). O primeiro sobrenadante (sp1) é separado do primeiro precipitado residual (ppt1), como por centrifugação. O precipitado residual (ppt1) é descartado. O sobrenadante clarificado (sp1) pode ser a seguir concentrado e diafiltrado contra, por exemplo 10 mM de fosfato de potássio/150 mM NaCl/0,1% Triton X-100 utilizando, por exemplo, um filtro de membrana NMWL de 300 kDa.

O primeiro sobrenadante é então incubado a uma temperatura e por um tempo para produzir um sobrenadante clarificado (sp2) contendo aglutinógenos e um segundo precipitado de descartar (ppt2) contendo contaminantes não aglutinógenos. Temperaturas apropriadas incluem aproximadamente 50°C a aproximadamente 100°C, incluindo

46

aproximadamente 75° a aproximadamente 85°C, e tempos de incubação apropriados incluem aproximadamente 1 a aproximadamente 60 minutos. O sobrenadante clarificado é então concentrado, por exemplo, pela adição de polietileno glicol com peso molecular de aproximadamente 8000 (PEG 8000) a uma concentração final de aproximadamente 4,5 ± 0,2% e agitando suavemente por um mínimo de aproximadamente 30 minutos para produzir um terceiro precipitado (ppt3) que pode ser coletado por centrifugação. O sobrenadante restante sp3 é descartado.

Este terceiro precipitado (ppt3) é extraído, por exemplo, com um tampão que compreende 10 mM de fosfato de potássio/150 mM NaCl para fornecer a solução contendo aglutinógeno fimbrial bruta. 1M de fosfato de potássio pode ser adicionado à solução fimbrial bruta para tornar aproximadamente 100 mM com relação a fosfato de potássio. Alternativamente, o sobrenadante clarificado de aglutinógenos fimbriais tratados termicamente pode ser purificado sem precipitação por cromatografia por filtração em gel utilizando um gel, como Sepharose CL6B. Os aglutinógenos fimbriais na solução bruta são então purificados por cromatografia de coluna, como, passando através de uma coluna de sílica PEI, para produzir a preparação de aglutinógeno fimbrial na passagem.

Esta passagem contendo aglutinógeno fimbrial pode ser adicionalmente concentrado e diafiltrado contra, por exemplo, um tampão contendo 10 mM de fosfato de potássio/150 mM NaCl utilizando uma membrana NMWL de 100-

300 kDa. A preparação de aglutinógeno pode ser esterilizada por filtração através de um filtro de membrana $\leq 0,22$ μ M, para fornecer a preparação de aglutinógeno fimbrial purificada, final, contendo aglutinógeno fimbrial 2 e 3 substancialmente isento de aglutinógeno 1. A razão de peso de Agg 2 para Agg 3 pode ser de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2:1. As vacinas podem conter outros imunógenos de *Bordetella* purificados incluindo hemaglutinina filamentosa, a proteína de membrana externa de 69 kDa e toxina de coqueluche ou um seu toxóide, incluindo análogos geneticamente detoxificados de PT.

Os outros imunógenos de *Bordetella*, toxina de coqueluche (incluindo seus análogos geneticamente detoxificados, como descrito, por exemplo em Klein e outros, patente norte-americana 5.085.862 cedida ao cessionário da presente e aqui incorporado mediante referência ao mesmo), FHA e a proteína de 69 kDa podem ser produzidos em forma purificada por uma variedade de métodos como descrito abaixo.

Purificação de PT

PT pode ser isolado do sobrenadante de cultura de uma cepa de *B. pertussis* utilizando métodos convencionais. Por exemplo, o método de Sekura e outros pode ser utilizado. PT é isolado primeiramente absorvendo sobrenadante de cultura sobre uma coluna contendo a matriz de gel ligante-corante, Affi-Gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). PT é eluído desta coluna por sal elevado, como, 0,75 M de cloreto de magnésio e, após remover o sal, é passado

através de uma coluna de matriz de afinidade Sefarose-fetuína composta de fetuína ligada a Sefarose ativada por brometo de cianogênio. PT é eluído da coluna de fetuína utilizando 4M de sal de magnésio.

5 Alternativamente, o método de Irons e outro pode ser utilizado. Sobrenadante de cultura é absorvido sobre uma coluna de Sepharose 4B ativada por CNB4 à qual haptoglobina é primeiramente covalentemente ligado. O PT se liga ao absorvente no pH 6,5 e é eluído da coluna utilizando tampão
10 0,1M Tris/0,5M NaCl por uma mudança em etapa para pH 10.

Alternativamente, o método descrito na patente norte-americana 4.705.686 concedida a Scott e outros em 10 de novembro de 1987 e aqui incorporada mediante referência à mesma pode ser utilizado. Neste método sobrenadantes de
15 cultura ou extratos celulares de *B.pertussis* são passados através de uma coluna de uma resina de permuta de ânion de capacidade suficiente para adsorver endotoxina porém permitir que antígenos de *Bordetella* fluam através ou de outro modo sejam separados da endotoxina.

20 Alternativamente, PT pode ser purificado utilizando cromatografia de perlite, como descrito na patente da Organização Européia de Patentes 336 736, cedida à cessionária da mesma e aqui incorporada mediante referência à mesma.

25 Detoxificação de PT

PT é detoxificado para remover atividades indesejáveis que poderiam causar reações colaterais da vacina final. Qualquer de uma variedade de métodos convencionais de

detoxificação química pode ser utilizada, como tratamento com formaldeído, peróxido de hidrogênio, tetranitro-metano ou glutaraldeído.

Por exemplo, PT pode ser detoxificado com glutaraldeído utilizando uma modificação do procedimento descrito em Munoz e outros. Neste processo de detoxificação PT purificado é incubado em uma solução contendo 0,01 M de solução salina tamponada com fosfato. A solução é feita 0,05% com glutaraldeído e a mistura é incubada em temperatura ambiente por duas horas, e a seguir feita 0,02 M com L-lisina. A mistura é adicionalmente incubada por duas horas em temperatura ambiente e a seguir dialisada por dois dias contra 0,01 M PBS. Em uma modalidade específica, o processo de detoxificação da patente EP no. 336 736 pode ser utilizado. Resumidamente PT pode ser detoxificado com glutaraldeído com a seguir:

PT purificado em 75 mM de fosfato de potássio em pH 8,0 contendo 0,22 M de cloreto de sódio é diluído com um volume igual de glicerol a concentrações de proteína de aproximadamente 50 a 400 ug/ml. A solução é aquecida a 37°C e detoxificada pela adição de glutaraldeído a uma concentração final de 0,5% (peso/v). A mistura é mantida a 37°C por 4 horas e a seguir ácido aspártico (1,5 M) é adicionado a uma concentração final de 0,25 M. A mistura é incubada em temperatura ambiente por 1 hora e a seguir diafiltrada com 10 volumes de 10 mM de fosfato de potássio em pH 8,0 contendo 0,15 M de cloreto de sódio e 5% de glicerol para reduzir o glicerol e remover o glutaraldeído.

59

O toxóide PT é filtrado-esterilizado através de uma membrana de 0,2 uM.

e técnicas recombinantes forem utilizadas para preparar uma molécula mutante PT que não mostra nenhuma ou mostra pouca toxicidade, para uso como a molécula formado em toxóide, detoxificação química não é necessária.

Purificação de FHA

FHA pode ser purificado do sobrenadante de cultura essencialmente como descrito por Cowell e outros. Promotores de crescimento, como beta-ciclodextrinas metiladas, podem ser utilizados para aumentar o rendimento de FHA em sobrenadantes de cultura. O sobrenadante de cultura é aplicado a uma coluna de hidroxilapatite. FHA é adsorvido sobre a coluna, porém PT não é. A coluna é extensamente lavada com Triton X-100 para remover endotoxina. FHA é então eluído utilizando 0,5M NaCl em 0,1M de fosfato de sódio e, se necessário, passado através de uma coluna fetuína-Sepharose para remover PT residual. Purificação adicional pode envolver passagem através de uma coluna Cl-6B Sepharose.

Alternativamente, FHA pode ser purificado utilizando anticorpos monoclonais ao antígeno, onde os anticorpos são afixados a uma coluna de afinidade ativada por CNBr.

Alternativamente, FHA pode ser purificado utilizando cromatografia de perlite como descrito na patente da Organização Européia de Patentes 336 736 acima mencionado.

Purificação de Proteína de Membrana externa de 69 kDa (pertactina)

5/6

A proteína de membrana externa de 69 kDa (69K ou pertactina) pode ser recuperada de células bacterianas primeiramente inativando as células com um agente bacteriostático, como timerosal, como descrito no EP 484 621 publicado e aqui incorporado mediante referência ao mesmo. As células inativadas são suspensa em um meio aquoso, como PBS (pH 7 a 8) e submetidas à extração repetida em temperatura elevada (45 a 60°C) com resfriamento subsequente até a temperatura ambiente ou 4°C. As extrações liberam a proteína 69K das células. O material contendo a proteína 69K é coletado por precipitação e passado através de uma coluna Affi-gel Blue. A proteína 69K é eluída com uma elevada concentração de sal, como 0,5M cloreto de magnésio. Após diálise, é passada através de um suporte de cromatofocalização.

Alternativamente, a proteína 69 kDa pode ser purificada do sobrenadante de cultura de uma cultura B. pertussis, como descrito no Pedido PCT publicado WO 91/15505, no nome da cessionária do presente e aqui incorporado mediante referência ao mesmo. Tal método é preferido uma vez que a pertactina é fornecida livre de materiais de cromatografia de corante ciclase adenilato.

Outros métodos apropriados de purificação da proteína de membrana externa 69 kDa de B. pertussis são descritos na patente U.S. no. 5.276.142, concedida a Gotto e outros em 4 de janeiro de 1984 e na patente norte-americana 5.101.014, concedida a Burns em 31 de março de 1992.

53/10

Outros Componentes da Invenção

As vacinas da invenção também contêm imunógenos não Bordetella incluindo toxóide de tétano, toxóide de difteria, poliovírus inativado (IPV) e, opcionalmente, um conjugado de toxóide de difteria ou toxóide de tétano e um polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Outros componentes potenciais das vacinas de multi-componentes incluem proteínas de membrana externa de *Haemophilus*, antígeno de superfície de hepatite B, caxumba, sarampo e rubéola.

Os conjugados do toxóide de tétano ou toxóide de difteria e o polissacarídeo capsular de Hib podem ser formados por isolamento de fosfato de ribitol poliribose (PRP) isolado de *H. influenzae* tipo b, derivando o PRP para fornecer um diidrazida de ácido adípico e conjugar covalentemente com toxóide de tétano ou toxóide de difteria para fornecer conjugados PRP-T ou PRP-D respectivamente.

Cada um dos antígenos é individualmente absorvido em um adjuvante, como fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio, coletivamente denominado alume, para fornecer produção conveniente e rápida de vacinas contendo quantidades relativas selecionadas destes antígenos nas vacinas como fornecido aqui.

Formulações de vacina multivalente selecionadas

Em modalidades selecionadas, a invenção fornece vacinas com as seguintes características (ug de proteínas aqui utilizadas se baseiam em resultados de teste Kjeldahl realizados em concentrados purificados e são expressos como

ug de nitrogênio de proteína), todas as quais podem ser administradas por injeção intramuscular:

a) CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (Híbrido):

Uma formulação compreende uma combinação de vacina de coqueluche de componente (CP) combinada com toxóides de difteria (DI) e tétano (T) e poliovírus inativado (mIPV) e é denominada CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (Híbrido). O poliovírus cultivado em células MRC-5 é designado mIPV enquanto poliovírus cultivado em células vero é designado IPV ou vIPV. Qualquer material de poliovírus inativado pode ser utilizado intercambiavelmente nas formulações.

Cada dose humana de 0,5 ml de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (Híbrido) foi formulada para conter aproximadamente:

20 ug de toxóide de coqueluche (PT)

20 ug de hemaglutinina filamentosa (FHA)

5 ug de aglutinógenos fimbriais 2 e 3 (FIM)

3 ug de proteína de membrana externa Pertactina (69 kDa)

15 Lf de toxóide de Difteria

5 Lf de toxóide de Tétano

40 D unidades de antígeno Poliovírus tipo 1

8 D unidades de antígeno Poliovírus tipo 2

32 D unidades de antígeno Poliovírus tipo 3

1,5 mg de fosfato de alumínio

0,6% de 2-fenoxietanol, como conservador.

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

Outra formulação compreende uma combinação de vacina de coqueluche de componente (CP) combinada com toxóides de

54
10

difteria (D) e tétano (T) e poliovírus inativado (mIPV) denominado CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (Híbrido) e é utilizado para reconstituir PRP-T liofilizada. A composição resultante contém, por dose de 0,5 ml, aproximadamente:

- 5 20 ug de toxóide de coqueluche (PT)
 20 ug de hemaglutinina filamentosa (FHA)
 5 ug de aglutinógenos fimbriais 2 e 3 (FIM)
 3 ug de proteína de membrana externa Pertactina
 (69 kDa)
- 10 15 Lf de toxóide de Difteria
 5 Lf de toxóide de Tétano
 10 ug de polissacarídeo capsular de fosfato
 ribitol poliribose purificado (PRP) de *Haemophilus*
 influenzae tipo b covalentemente ligado a 20 ug de toxóide
 15 de tétano
- Poliovírus tipo 1 40 D unidades de antígeno
 Poliovírus tipo 2 8 D unidades de antígeno
 Poliovírus tipo 3 32 D unidades de antígeno
 1,5 mg de fosfato de alumínio
- 20 0,6% de 2-fenoxietanol

c) CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV (Híbrido): = (b)

Uma formulação adicional compreende uma combinação de vacina de coqueluche de componente (CP) combinada com toxóides de difteria (D) e tétano (T), poliovírus inativado

25 (mIPV) e PRP-T e é denominado CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV (Híbrido). Cada dose humana de 0,5 ml da presente composição contém aproximadamente:

20 ug de toxóide de coqueluche (PT)

55

20 ug de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 ug de aglutinógenos fimbriais 2 e 3 (FIM)
3 ug de proteína de membrana externa Pertactina
(69 kDa)

5 15 Lf de toxóide de Difteria
5 Lf de toxóide de Tétano
10 ug de polissacarídeo capsular de fosfato
ribitol ribose purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae*
tipo b covalentemente ligado a 20 ug de toxóide de tétano

} PRP-T

10 Poliovírus tipo 1 40 D unidades de antígeno
Poliovírus tipo 2 8 D unidades de antígeno
Poliovírus tipo 3 32 D unidades de antígeno
1,5 mg de fosfato de alumínio
0,6% de 2-fenoxietanol

15 Experimentos clínicos

(a) Vacina de coqueluche de componente DTP

Diversos experimentos clínicos foram realizados em seres humanos como descrito aqui para estabelecer a segurança, não reatogenicidade e utilidade de vacinas de coqueluche de componente contendo aglutinógenos fimbriais preparados como descrito aqui, para proteção contra coqueluche. Em particular, as respostas imunes a cada um dos antígenos contidos nas vacinas (Tabela 3) foram obtidas. Uma vacina de coqueluche multivalente, específica, CP_{10/5/5/3}DT foi analisada em um grande experimento clínico duplo-randomizado, de multi-centro, controlado por placebo em uma população humana em risco para calcular a eficácia da vacina contra coqueluche típica.

A definição do caso para doença típica de coqueluche foi:

vinte e um dias ou mais de tosse espasmódica, e
B.pertussis de cultura confirmada,

5 ou

evidência sorológica de infecção específica de *Bordetella* indicada por um aumento de 100% de anticorpo IgA ou IgG em ELISA contra FHA ou PT em soro em pares,
ou

10 se dados sorológicos estiverem ausentes,

a criança em estudo esteve em contato com um caso de *B.pertussis* de cultura confirmada no lar com início de tosse até 28 dias antes ou após o início de tosse na criança em estudo.

15 Os resultados deste estudo mostraram CP_{10/5/5/3}DT como sendo aproximadamente 85% eficaz na prevenção de coqueluche como definido na definição do caso para doença típica de coqueluche como descrito acima. No mesmo estudo, uma vacina
20 PT e FHA foi aproximadamente 58% eficaz (PT₂₅.FHA₂₅.DT) e uma vacina de coqueluche de célula integral (DTP) foi aproximadamente 48% eficaz (Tabela 4). Além disso, a vacina CP_{10/5/5/3}DT evitou coqueluche branda definida como uma tosse com pelo menos um dia de duração até uma eficácia de
25 aproximadamente 77%. Em particular, o perfil de resposta imune obtida foi substancialmente igual àquele obtido após imunização com vacinas de coqueluche de célula integral que são reportadas como sendo altamente eficazes contra

57/10

coqueluche.

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

(I) A segurança e imunogenicidade de vacinas de coqueluche de componente em combinação com toxóide de difteria e toxóide de tétano adsorvido, vacina conjugada de toxóide de tétano Haemophilus influenzae tipo b e vacina de poliomielite inativada ^{Univax} cultivada em células vero (CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV) foram comparadas com vacina de coqueluche de célula integral (a) em combinação com toxóides de difteria e tétano e vacina de poliomielite inativada e adsorvida (b) em combinação com toxóides de tétano e difteria e vacina de poliomielite inativada e adsorvida cultivada em células MRC-5 (adsorvidas DPT-pólio) utilizada para reconstituir vacina conjugada de toxóide de tétano de Haemophilus influenzae tipo b liofilizada (PENTA™), ou c) vacina de coqueluche de componente em combinação com vacina conjugada de toxóide de tétano de Haemophilus influenzae tipo b adsorvida de toxóides de tétano e difteria e vacina de poliomielite inativada cultivada em células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-mIPV) dadas separadamente de ou utilizadas para reconstituir vacina conjugada de toxóide de tétano de Haemophilus influenzae tipo b (PRP-T) em crianças com 2, 4, 6 e 18 meses de idade.

Este experimento controlado randomizado registrou 897 bebês com dois meses de idade para receber um de oito braços de vacina diferentes: CP_{20/20/5/3} DT-PRP-T-IPV (líquido); CP_{20/20/5/3}Dt dado simultaneamente porém em local diferente de PRP-T; ou a vacina de controle, DPT-pólio de

56
h

célula integral utilizada para reconstituir PRP-T (PENTA™).

Todas as vacinas de estudo foram bem toleradas. Nenhuma diferença significativa em taxas de reação foi vista entre os dois tipos de combinações de coqueluche recombinantes. As crianças que receberam CP_{20/20/5/3}DT-mIPV combinado utilizado para reconstituir PRP-T tinham taxas ligeiramente mais elevadas de reações locais em comparação com os mesmos produtos administrados em locais diferentes. Todas as combinações de coqueluche de componente tinham taxas compativelmente mais baixas de reações local e sistêmica do que a combinação de célula integral. As diferenças em taxas de reação entre vacinas de coqueluche de componente e célula integral foram mais evidentes nas 24 horas imediatamente após vacinação.

As duas combinações de coqueluche de componente produziram respostas excelentes a todos os antígenos. Em todas as situações, respostas de PT, FHA e pertactina de coqueluche foram superiores a respostas vistas para combinações de célula integral. Nenhuma diferença significativa foi vista entre combinações de componente e célula integral. Nenhuma diferença significativa foi vista entre formulações de componente e célula integral para anti-PRP, difteria e pólios 1 e 2. As duas formulações de coqueluche de componente produziram respostas de tétano mais elevadas do que PENTA™. As duas formulações de componente produziram respostas sorológicas similares a todos os antígenos exceto pólio 3, para o qual CP_{20/20/5/3}DT-

59

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 afetou respostas sorológicas a quaisquer antígenos exceto tétano. Em grupos tanto combinados como
5 separados, 100% das crianças foram protegidas (>0,1 EU/ml) contra tétano após 3 doses de vacina.

Mais importante ainda, todos os grupos de vacina tiveram boas respostas a PRP-T com 98,3% de crianças obtendo níveis > 0,15 ug/ml e mais de 86,1% de crianças
10 obtendo níveis > 1,0 ug/ml. Estes dados são comparáveis com aqueles observados em estudos anteriores nos quais a vacina de coqueluche de célula integral foi utilizada com PRP-T.

As respostas sorológicas obtidas e descritas acima são mostradas nas Tabelas 5 a 7 (H = híbrido).

15 (II) Segurança e imunogenicidade de vacina de coqueluche de componente em combinação com toxóides de tétano e difteria e vacina de poliomielite inativada e adsorvida cultivadas em células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-mIPV)
dadas separadamente de ou utilizadas para reconstituir
20 vacina conjugada de toxóide de tétano de *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PRP-T) foram comparados com vacina de coqueluche de célula integral em combinação com toxóides de tétano e difteria e vacina de poliomielite inativada e adsorvida cultivada em células MRC-5 (DPT-pólio
25 adsorvido) utilizado para reconstituir vacina conjugada de toxóide de tétano *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PENTA™) em crianças com 18 a 19 meses de idade.

Este estudo de cinco braços incluía um braço de

controle PENTA™ de célula integral e CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T. O quinto grupo recebeu CP_{20/20/5/3}DT-mIPV simultaneamente porém em um local diferente de PRP-T. Quatrocentos e oitenta e nove pessoas receberam vacina com 18-19 meses de idade das quais 466 (95%) completaram o estudo de acordo com o protocolo. CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T era significativamente menos reatogênico do que PENTA™ particularmente nas 24 primeiras horas após vacinação. O produto reconstituído teve taxas ligeiramente mais elevadas de reações locais do que o produto separadamente administrado.

PENTA™ produziu respostas de pólio 1 mais elevadas do que CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T. Nenhuma diferença significativa foi vista para anti-PRP, difteria, aglutinina de coqueluche, fimbrias, pólio 2 ou pólio 3. CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produziu respostas sorológicas de coqueluche PT, FHA e pertactina. CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produziu respostas sorológicas compatíveis com todos os antígenos testados. Nenhuma diferença significativa foi vista entre CP_{20/20/5/3}DT-mIPV dado separadamente versus utilizado para reconstituir PRP-T exceto com antitoxina de tétano (6,78 vs 4,91 EU/ml).

Este estudo demonstrou que CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produziu respostas sorológicas compatíveis em três lotes e foi mais imunogênico do que PENTA™ para respostas de coqueluche. CP_{20/20/5/3}DT-mIPV também

produziu taxas significativamente mais baixas de reações locais e sistêmicas do que PENTA™.

(III) A segurança e imunogenicidade de vacina de coqueluche de componente combinada com toxóides de tétano e difteria adsorvidos e vacina de poliomielite inativada cultivada em células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-mIPV) foram comparados com vacina de coqueluche de célula integral em combinação com toxóides de tétano e difteria adsorvidos e vacina de poliomielite inativa cultivada em células MRC-5 (DPT-pólio adsorvido) em crianças com 4 a 6 anos de idades.

Cento e sessenta e quatro pessoas foram alocadas aleatoriamente em uma razão de 4 para 1 para receber CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (n=131) ou DPT-pólio (n=33). Nenhum evento adverso significativo ou grave ocorreu no estudo.

CP_{20/20/5/3}DT-mIPV teve taxas compativelmente mais baixas de reações tanto local como sistêmica particularmente no período de 0 a 24 horas. Reações locais eram comuns para os dois grupos com 97% de DPT-pólio e 76,9% de receptores de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV tendo alguma reação local no período de 0 a 24 horas. Reações locais de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV eram normalmente brandas ou moderadas. Em contraste, mais da metade de receptores de DPT-pólio tiveram reações locais classificadas como graves. Sensibilidade de local de injeção normalmente desapareceu em 72 horas porém a vermelhidão ou inchaço tendeu a persistir bem no período de 24 a 72 horas.

Reações sistêmicas no período de 0 a 24 horas eram menos comuns em receptores CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (38,5%) do que

62
H

em receptores DPT-pólio (90,9%). Reações sistêmicas no período de 24-72 horas foram incomuns para os dois grupos.

As respostas de difteria, tétano, pólio 2 e 3 foram comparáveis entre as duas vacinas. Os receptores de DPT-pólio tiveram uma resposta de pólio 1 significativamente mais elevada (15.462) do que os receptores de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (10.903). Todas as pessoas tiveram excelentes respostas e seriam consideradas protegidas contra as respectivas doenças. Respostas sorológicas a todos os antígenos de coqueluche eram significativamente mais elevadas em receptores de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV.

(IV) A segurança e imunogenicidade de vacina de coqueluche componente em combinação com toxóides de difteria e tétano adsorvidos, vacina conjugada de toxóide de tétano *Haemophilus influenzae* tipo b e vacina de poliomielite inativada cultivada em células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-mIPV) foram comparadas com vacina de coqueluche de célula integral em combinação com toxóides de difteria e tétano adsorvidos e vacina de poliomielite inativada cultivada em células MRC-5 (DPT-pólio adsorvido) utilizado para reconstituir vacina conjugada de toxóide de tétano *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PENTA™) ou vacina de coqueluche de componente em combinação com toxóides de tétano e difteria adsorvidos e vacina de poliomielite inativada cultivada em células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-mIPV) utilizadas para reconstituir vacina conjugada de toxóide de tétano *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PRP-T) em crianças com 18 a 19 meses de

63

idade.

A finalidade deste estudo cego, único, controlado randomizado de três braços foi avaliar a segurança e imunogenicidade das duas combinações de coqueluche acelulares novas, CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV e CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizadas para reconstituir PRP-T, com PENTA™ (pólio DPT de coqueluche de célula integral utilizado para reconstituir PRP-T) em crianças de 18 a 19 meses de idade. Um total de 99 crianças; 33 em cada um dos três grupos de vacina participou, das quais 97 (98%) completaram o estudo de acordo com o protocolo.

Nenhuma reação grave foi observada neste estudo. Receptores PENTA™ era significativamente mais provável de experimentar reações locais e sistêmicas moderadas ou graves do que receptores das duas outras vacinas. As diferenças foram mais acentuadas em 24 horas e atingiram importância estatística por febre, vermelhidão, inchaço, sensibilidade, rebuliço, atividade reduzida e comer menos. As reações tenderam a ser brandas em crianças que receberam combinações de coqueluche de componente. Nenhuma diferença significativa em taxas de reação foi vista entre as duas formulações de coqueluche de componente embora rebuliço fosse visto mais freqüentemente em 24 horas naqueles recebendo CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T vs CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV (18% vs 3%).

Respostas sorológicas foram satisfatórias com 100% de participantes obtendo níveis considerados de proteção para antitoxina de difteria ($\geq 0,01$ IU/ml), antitoxina de tétano

($\geq 0,01$ IU/ml) e anti PRP ($\geq 1,0$ ug/ml). Anticorpos de neutralização detectáveis a pólio tipos 1, 2 e 3 foram vistos em todos os participantes após imunização.

As respostas de difteria foram mais elevadas em receptores PENTA™ refletindo o teor mais elevado de antígeno desta vacina (25 Lf vs 15 Lf).

Anticorpos de coqueluche foram compativelmente mais elevados nas duas combinações de coqueluche de componente versus PENTA™ atingindo importância estatística para respostas GMT anti-PT, anti-FHA e anti-pertactina. Anticorpos de aglutinação de coqueluche e anti-fimbrial também foram mais elevados em receptores de coqueluche de componente embora as diferenças não atingissem importância estatística.

Em resumo, este estudo mostrou que as duas combinações de coqueluche 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 taxas de reação satisfatoriamente baixas e elevadas respostas sorológicas quando dadas como um reforço para crianças com 18 a 19 meses de idade.

(V) A segurança e imunogenicidade de vacina de coqueluche de componente em combinação com difteria e toxóide de tétano adsorvido (CP_{20/20/5/3}DT) individualmente ou em combinação com um ou dois poliovírus inativados, um mIPV, cultivado em células MRC-5 e o outro vIPV cultivado em células vero, ou vacina de poliomielite oral (OPV) em crianças com 17 a 19 meses de idade.

Este estudo de cinco braços foi designado para

65

examinar a interação entre CP_{20/20/5/3}DT e dois IPVs (cultivados em células Vero ou em células MRC-5). Os dois IPVs foram combinados como um produto líquido único com CP_{20/20/5/3}DT-mIPV e CP_{20/20/5/3}DT-vIPV ou dados simultaneamente porém em um local de injeção separado (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 simultaneamente. Todas as pessoas receberam PRP-T na tirada de sangue após imunização. Respostas anti-PRP não foram avaliadas neste estudo.

PROJETO DE ESTUDO

Número	Visita 1 (17-19 meses)	Visita 2 (+1 mês)
85	1. CP _{20/20/5/3} DT-mIPV (1 injeção)	PRP-T
85	2. CP _{20/20/5/3} DT+mIPV (2 injeções)	PRP-T
85	3. CP _{20/20/5/3} DT-vIPV (1 injeção)	PRP-T
85	4. CP _{20/20/5/3} DT+vIPV (2 injeções)	PRP-T
85	5. CP _{20/20/5/3} DT+OPV (1 injeção)	PRP-T

Em geral, não houve diferença nas taxas de reações adversas reportadas após as vacinas de poliomielite inativadas derivadas de célula vero ou MRC-5, quer a vacina tenha sido dada como uma injeção separada ou combinada com a vacina CP_{20/20/5/3}DT (Híbrido).

Nenhuma diferença significativa foi vista entre grupos para PT, FHA e pertactina. As respostas em crianças que

66

CP_{20/20/5/3}DT (Híbrido) e OPV foram ligeiramente porém não significativamente mais elevadas do que em crianças recebendo CP_{20/20/5/3}DT (Híbrido) e IPV de célula Vero para FIM, aglutinina de coqueluche, difteria e tétano. As

respostas de pólio eram geralmente comparáveis ou mais elevadas em crianças recebendo um IPV versus uma vacina OPV. Todos exceto um indivíduo tiveram aglutinina de coqueluche > 1:64. Todos exceto um indivíduo atingiram níveis de antitoxina de difteria ≥ 0,1 U/ml e todos atingiram níveis de antitoxina de tétano ≥ 0,1 EU/ml.

Os resultados deste estudo demonstraram que CP_{20/20/5/3}DT (Híbrido) em combinação com IPV (quer célula Vero ou MRC-5) é seguro e imunogênico em crianças de 17 a 19 meses de idade. As vacinas de combinação eram pelo menos tão imunogênicas quanto a vacina dada como injeções separadas e em alguns casos mais imunogênica. A combinação da vacina como uma injeção única não foi associada a um aumento significativo em reações adversas locais. Nenhuma diferença substancial foi detectada nas reações adversas ou resposta imune às duas preparações de IPV quer como injeções separadas ou produtos combinados. A inclusão de IPV não aumentou a taxa de reações adversas em comparação com CP_{20/20/5/3}DT (Híbrido) fornecido individualmente (isto é, com OPV).

Os resultados sorológicos obtidos no estudo são resumidos na Tabela 8 (H = híbrido).

(VI) A segurança e imunogenicidade de vacinas de coqueluche de componente em combinação com toxóides de

tétano e difteria adsorvidos (CP_{20/20/5/3}DT e CP_{10/10/5/3}DT) individualmente ou em combinação com vacina conjugada *Haemophilus influenzae* tipo b foram determinados em crianças de 17 a 19 meses de idade.

5 O estudo de seis braços foi designado para examinar a interação entre formulações de coqueluche de componente tanto clássico (CP_{10/10/5/3}DT) como Híbrido (CP_{20/20/5/3}DT) e Vacina conjugada de *Haemophilus influenzae* tipo B (PRP-T) em crianças de 18 a 19 meses de idade.

10 Três programas foram utilizados, nos quais (a) cada uma das vacinas de coqueluche de componente foi utilizada para reconstituir PRP-T, (b) dados simultaneamente porém em um local separado de PRP-T ou (c) PRP-T foi dado 1 mês após a vacina de coqueluche de componente. Todas as crianças
15 receberam OPV na primeira visita e foram providas com a mesma vacina de coqueluche de componente com 2, 4 e 6 meses de idade. Todas as crianças tinha participado previamente no grande estudo de segurança destas duas formulações de vacina.

20 Um total de 545 pessoas foi registrado no estudo dos quais 542 (99%) completaram o estudo.

PROJETO DE ESTUDO

NÚMERO	VISITA 1 (17-19 meses)		VISITA 2 (+1 mês)	VISITA 3 (+2 meses)
154	1. CP _{20/20/5/3} DT utilizado para reconstituir PRP-T		sangue	-

152	CP _{20/20/5/3} DT dado simultaneamente com PRP-T OPV	SANGUE + OPV	sangue	-
159	CP _{20/20/5/3} DT		PRP-T	sangue
27	CP _{10/5/5/3} DT utilizado para reconstituir PRP-T		sangue	-
29	CP _{10/5/5/3} DT dado simultaneamente com PRP-T	SANGUE + OPV	sangue	-
21	CP _{10/5/5/3} DT		PRP-T	sangue

Respostas sorológicas foram geralmente mais elevadas para a maioria dos antígenos quando uma vacina de combinação de coqueluche de componente e PRP-T foram dados no mesmo dia em comparação com em dias separados (Tabela 9).

De modo importante, respostas anti-PRP não foram diminuídas quando PRP-T foi dado separadamente versus combinado com uma vacina de combinação de coqueluche de componente no mesmo dia. GMTs após imunização em crianças que receberam as vacinas em dias separados foram significativamente mais baixos. As diferenças em respostas anti-PRP entre injeções combinadas e separadas foram vistas quando as pessoas foram estratificadas por formulação de vacina de coqueluche de componente. Receptores de CP_{20/20/5/3}DT (Híbrido) demonstraram níveis anti-PRP inferiores quando a vacina foi dada combinada ao invés de

64

separadamente. Estas diferenças não eram vistas com os receptores de CP_{10/5/5/3}DT e as diferenças desapareceram quando os grupos foram combinados. Todos os participantes atingiram níveis anti-PRP $\geq 0,15$ ug/ml e mais de 98% de cada grupo tinha nível $\geq 1,0$ ug/ml. Apenas quatro participantes (0,7%) no estudo falharam em obter este nível; três nas injeções separadas em dias separados e um no grupo de injeção combinada. Mais de 82% de cada grupo excedeu títulos de 10 ug/ml de anticorpo anti-PRP.

Das reações locais causadas, apenas sensibilidade foi relatada mais freqüentemente no grupo combinado (27,8%) comparado com o grupo de vacinação de dia separado (16,7%). Esta taxa não foi diferente daquela vista no grupo que recebeu vacinas no mesmo dia que injeções separadas (24,2%).

No geral, uma reação sistêmica foi reportada com freqüência similar (60 a 62,1%) em participantes de cada um dos grupos de vacina. Febre foi reportada em aproximadamente um terço dos participantes. Apenas agitação foi reportado mais comumente no grupo de injeção combinada (33,3%) em comparação com os grupos de injeção separada (22,0%) ou de dia separado (22,8%).

Para resumir os resultados deste experimento, a administração simultânea 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 porém pode na realidade ter aumentado as mesmas. Respostas sorológicas a outros antígenos também foram excelentes. Tétano foi o único antígeno afetado quando as duas vacinas

foram misturadas juntas porém todas as crianças tiveram altos níveis de proteção.

Para os experimentos clínicos mencionados por último 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 3 ug/ml) foram preparadas. Antígenos de coqueluche componente foram individualmente adsorvidos em fosfato de alumínio 3 mg/ml na ausência de conservador. A este respeito, PT estavam em 10 mM de fosfato de potássio, 0,15M NaCl, 5% de glicerol, FHA estava em 10 mM de fosfato de potássio, 0,5M de NaCl, 69K estava em 10 mM de fosfato de potássio, 0,15M de NaCl, e fímbrias estavam em 10 mM de fosfato de potássio, 0,15M NaCl. D foi absorvido em fosfato de alumínio (6,25 mg/ml) a uma concentração de 300 Lf/ml. 2-fenoxietanol é adicionado como conservador a 0,6%. T foi adsorvido em fosfato de alumínio (6,25 mg/ml) a uma concentração de 300Lf/ml. 2-fenoxietanol é adicionado a 0,6%.

Os antígenos de coqueluche de componente adsorvido foram combinados com D adsorvido e T adsorvido a uma concentração de 3,65 doses/ml ou 55% do volume final. O teor de 2-fenoxietanol foi de 0,6%. Antes da combinação com mIPV ou v-IPV/PRP-T, esterilizada, teor de alumínio e teor de 2-fenoxietanol foram confirmados. Para 5ml, m-IPV e 2-fenoxietanol foram adicionados e diluídos até a resistência final. Para A5I, v-IPV, PRP-T e 2-fenoxietanol foram adicionados e diluídos até a resistência final.

Em resumo dos resultados de experimento clínico com

21

vacinas multivalentes, pode ser visto que CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produz respostas sorológicas comparáveis a difteria, tétano e pólios 1, 2 e 3 em comparação com PENTATM (contendo vacina de coqueluche de célula integral). Respostas anti-PRP são comparáveis ou mais elevadas do que aquelas observadas com PENTATM em doses tanto de bebê como de reforço. Respostas de tétano são mais baixas do que CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T quando comparado com CP_{20/20/5/3}DT-mIPV dado separadamente de PRP-T, porém esta redução não é clinicamente relevante. Compatível com outros estudos, a vacina de célula integral produz respostas de aglutinina e fímbria comparáveis ou mais elevadas do que vacina de coqueluche componente, contudo, a vacina de célula integral utilizada é conhecida como contendo um componente fimbrial altamente imunogênico. Todas as outras respostas de coqueluche eram compativelmente mais elevadas com CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T do que com PENTATM. Desse modo, a presente invenção fornece composições imunogênicas multi-valentes nas quais as respostas imunes aos antígenos não são diminuídas ou prejudicadas pelos outros componentes ou por sua inclusão na vacina multivalente. Respostas imunes diminuídas são às vezes mencionadas como interferência.

Preparação e Uso da Vacina

Desse modo, composições imunogênicas, adequadas para serem utilizadas como vacinas, podem ser preparadas dos imunógenos como aqui revelado. A vacina causa uma resposta

imune em uma pessoa que produz anticorpos.

Composições imunogênicas incluindo vacinas podem ser preparadas como injetáveis, como soluções líquidas ou emulsões. Os imunógenos podem ser misturados com excipientes farmacologicamente aceitáveis que são compatíveis com os imunógenos. Tais excipientes podem incluir água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol, e suas combinações. As composições imunogênicas e vacinas podem conter ainda substâncias auxiliares, como agentes de umedecimento ou emulsificante, agentes de tamponamento de pH, ou adjuvantes para aumentar a eficácia dos mesmos. Composições imunogênicas e vacinas podem ser administradas parenteralmente, por injeção subcutaneamente ou intramuscularmente. As preparações imunogênicas e vacinas são administradas em um modo compatível com a formulação de dosagem, e em tal quantidade como será terapeuticamente eficaz, imunogênico e protetor. A quantidade a ser administrada depende da pessoa a ser tratada, incluindo, por exemplo, a capacidade do sistema imune da pessoa sintetizar anticorpos, e se necessário, produzir uma resposta imune mediada por célula. Quantidades precisas de ingrediente ativo necessário ser administrado dependem da decisão do médico. Contudo, faixas de dosagem adequadas são facilmente determinadas por uma pessoa versada no estado da técnica e podem ser da ordem de microgramas dos imunógenos. Regimes adequados para administração inicial e doses de reforço também são variáveis, porém podem incluir uma administração inicial seguida por administrações

23/10

subseqüentes. A dosagem também pode depender da via de administração e variará de acordo com o tamanho do hospedeiro.

A concentração dos imunógenos em uma composição imunogênica de acordo com a invenção é em geral aproximadamente 1 a aproximadamente 95%. A imunogenicidade pode ser aperfeiçoada de forma significativa se os antígenos forem co-administrados com adjuvantes, comumente utilizados como 0,005 a 0,5 por cento de solução em solução salina tamponada com fosfato. Os adjuvantes aumentam a imunogenicidade de um antígeno porém não são necessariamente imunogênicos eles próprios. Os adjuvantes podem atuar retendo o antígeno localmente próximo ao local de administração para produzir um efeito de depósito facilitando uma liberação lenta e contínua de antígeno para células do sistema imune. Os adjuvantes também podem atrair células do sistema imune para um depósito de antígeno e estimular tais células a causar respostas imunes.

Os agentes imunoestimuladores ou adjuvantes têm sido utilizados há muitos anos para aperfeiçoar as respostas imunes hospedeiras, por exemplo, a vacinas. Adjuvantes intrínsecos, como lipopolissacarídeos, são normalmente os componentes das bactérias exterminadas ou atenuadas utilizadas como vacinas. Adjuvantes extrínsecos são imunomoduladores que são tipicamente não covalentemente ligados a antígenos e são formulados para aumentar as respostas imunes do hospedeiro. Desse modo, adjuvantes têm sido identificados que aumentam a resposta imune a

antígenos fornecidos parenteralmente. Alguns destes adjuvantes são tóxicos, contudo, e podem causar efeitos colaterais indesejáveis, tornando os mesmos inadequados para uso em seres humanos e muitos animais. Realmente, apenas hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio (coletivamente mencionados comumente como alume) são rotineiramente utilizados como adjuvantes em vacinas para seres humanos e veterinárias. A eficácia de alume em aumentar as respostas de anticorpo aos toxóides de tétano e difteria é bem estabelecida.

Uma ampla faixa de adjuvantes extrínsecos pode provocar respostas imunes potentes a antígenos. Estas incluem saponinas complexadas com antígenos de proteína de membrana (complexos de estimulação imune), polímeros plurônicos com óleo mineral, microbactérias exterminadas em óleo mineral, adjuvante completo de Freund, produtos bacterianos, como dipeptídeo de muramila (MDP) e lipopolissacarídeo (LPS), bem como lipídeo A, e lipossomas.

Para induzir de forma eficiente, respostas imunes humorais (HIR) e imunidade mediada por célula (CMI), os imunógenos são freqüentemente emulsificados em adjuvantes. Muitos adjuvantes são tóxicos, induzindo granulomas, inflamações agudas e crônicas (adjuvante completo de Freund, FCA), citólise (saponinas e polímeros Plurônicos), e pirogenicidade, artrite e uveíte anterior (LPS e MDP). Embora FCA seja um excelente adjuvante e amplamente utilizado em pesquisa, não é licenciado para uso em vacinas humanas ou veterinárias devido a sua toxicidade.

Características desejáveis de adjuvantes ideais incluem:

- 1) ausência de toxicidade;
- 2) capacidade de estimular uma resposta imune de longa duração;
- 3) simplicidade de fabricação e estabilidade em armazenagem de longa duração;
- 4) capacidade de causar tanto CMI como HIR a antígenos administrados por várias ias;
- 5) sinergia com outros adjuvantes;
- 6) capacidade de interagir seletivamente com populações de células apresentando antígeno (APC);
- 7) capacidade de causar especificamente respostas imunes específicas de célula T_H1 ou T_H2 apropriadas; e
- 8) capacidade de aumentar seletivamente níveis de isotipo de anticorpo apropriados (por exemplo, IgA) contra antígenos.

A patente norte-americana 4.855.283 concedida a Lockhoff e outros em 8 de agosto de 1989 que é aqui incorporada mediante referência à mesma revela análogos de glicolípídeo incluindo N-glicosilamidas, N-glicosiluréias e N-glicosilcarbamatos, cada um dos quais é substituído no resíduo de açúcar por um aminoácido, como imunomoduladores ou adjuvantes. Desse modo, Lockhoff e outros (patente norte-americana 4.855.283) reportaram que análogos de N-glicolípídeo exibindo similaridades estruturais aos glicolípídeos de ocorrência natural, como glicosfingolípídeos e glicoglicerolípídeos, são capazes de

causar respostas imunes fortes tanto em vacina de vírus de herpes simples como vacina de vírus de pseudo-raiva. Alguns glicolipídeos foram sintetizados de alquilaminas - cadeia longa e ácidos graxos que são ligados diretamente com os açúcares através do átomo de carbono anomérico, para imitar as funções dos resíduos de lipídeo de ocorrência natural.

A patente norte-americana 4.258.029 concedida a Moloney, cedida à cessionária da presente e aqui incorporada mediante referência à mesma, revela que hidrocloreto de tirosina de octadecila (OTH) funciona como um adjuvante quando complexado com toxóide de tétano e vacina de vírus de poliomielite tipo I, II e III inativada por formalina. Além disso, Nixon-George e outros, reportaram que ésteres de octodecila de aminoácidos aromáticos complexados com um antígeno superficial de hepatite B recombinante, aumentaram as respostas imunes do hospedeiro contra vírus de hepatite B.

EXEMPLOS

A revelação acima descreve, genericamente, a presente invenção. Um entendimento mais completo pode ser obtido mediante referência aos seguintes Exemplos específicos. Estes exemplos são descritos unicamente para fins de ilustração e não pretendem limitar o âmbito da invenção. Mudanças em forma e substituição de equivalentes são consideradas conforme as circunstâncias possam sugerir ou tornar apropriado. Embora termos específicos tenham sido aqui empregados, tais termos são destinados em um sentido

27

descritivo e não para fins de limitação.

Os métodos de bioquímica de proteína, fermentação e imunologia utilizados porém não explicitamente descritos nesta revelação e estes Exemplos são amplamente reportados na literatura científica e estão compreendidos na capacidade daqueles versados no estado da técnica.

Exemplo 1:

Este exemplo descreve o crescimento de *Bordetella pertussis*.

Semente mestre:

Culturas de semente mestre de uma cepa de *Bordetella pertussis* foram mantidas como lotes de semente secas por congelamento, a 2°C até 8°C.

Semente de trabalho:

A cultura seca por congelamento foi recuperada em meio Hornibrook e utilizada para semear placas de Agar 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	5,05
hexaidrato cloreto de magnésio	0,025 g
cloreto de potássio	0,200 g
fosfato de potássio dibásico	0,250 g
amido	1,0 g
água destilada	até 1,0 litro

O pH é ajustado para $6,9 \pm 0,1$ com solução de carbonato de sódio a 1%. O meio é dispensado em tubos e esterilizado por formação de vapor na autoclave por 20 minutos e colocando em autoclave por 20 minutos a 121°C até 124°C . A semente foi subcultivada duas vezes, primeiramente em placas BGA a seguir em Ágar de Coqueluche de Componente (CPA). O Ágar de Coqueluche de Componente (CPA) tem a seguinte composição:

NaCl	2,5 g/L
KH_2PO_4	0,5 g/L
KCl	0,2 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$	0,1 g/L
base Tris	1,5 g/L
ácidos casamino	10,0 g/L
NaH Glutamato	10,0 g/L
HCl conc.	até pH 7,2
ágar	15,0 g/L

fatores de crescimento

(CPGF)	10,0 ml/L
--------	-----------

Os fatores de crescimento de coqueluche de componente (CPGF) - 100X tem a seguinte composição:

L-cisteína HCl	4,0 g/L
niacina	0,4 g/L
ácido ascórbico	40,0 g/L
glutathiona, reduzida	15,0 g/L
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$	1,0 g/L
dimetila-B-ciclodextrina	100 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$	2,0 g/L



A cultura final foi suspensa em Tampão de Suspensão de semente de Coqueluche (CPSB), dispensada em alíquotas de 2 a 4 ml e armazenada congelada a -60°C até -85°C . O Tampão de Suspensão de Semente de Coqueluche (PSSB) tem a seguinte composição:

ácidos casamino	10,0 g/L
base Tris	1,5 g/L
glicerol anidro	100 mL/L
HCl conc.	até pH 7,2

Estas suspensões de glicerol forneceram o material de partida para a preparação da semente de trabalho.

Processo de cultivo:

A propagação da semente de trabalho foi conduzida em garrafas Roux de Ágar de Coqueluche de componente por 4 a 7 dias a 34°C até 38°C . Após este cultivo, as células foram retiradas por lavagem do ágar com Caldo de Coqueluche de Componente (CPB). As amostras foram observadas por coloração Gram, em relação à pureza de cultura e opacidade.

As células foram transferidas para frascos cônicos de 4 litros contendo CPB e incubadas a 34°C até 38°C por 20 a 26 horas com agitação. As amostras foram observadas por coloração Gram e a pureza de cultura foi checada. Os frascos foram agrupados e a suspensão foi utilizada para semear dois fermentadores contendo CPB (volume de 10 litros iniciando em OD_{600} 0,1 - 0,4). A semente foi crescida até um OD_{600} final de 5,0 a 10,0. As amostras foram testadas por coloração Gram, em relação à pureza de cultura, por ELISAs específicos de antígeno e em relação à esterilidade.

40

Exemplo 2:

Este exemplo descreve a purificação de antígenos da cultura de célula de *Bordetella pertussis*.

Produção de concentrados de célula e caldo:

5 A suspensão bacteriana foi cultivada em dois fermentadores de produção, a 34°C até 37°C por 35 a 50 horas. Os fermentadores foram amostrados para teste de esterilidade de meio. A suspensão foi alimentada para uma centrífuga de pilha de disco de fluxo contínuo (12.000 x g) para separar as células do caldo. As células foram coletadas para esperar extração de componente de fímbrias. O licor clarificado foi passado através de filtro de membrana $\leq 0,22$ μm . O licor filtrado foi concentrado por ultra filtração utilizando uma membrana limite de peso molecular nominal (NMWL) de 10 a 30 kDa. O concentrado foi armazenado para esperar a separação e purificação dos componentes de Toxina de Coqueluche (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) e 69 kDa (pertactina).

Separação dos componentes de caldo:

20 Os componentes do caldo (69 kDa, PT e FHA) foram separados e purificados por etapas de eluição seletiva e cromatografia de perlite, essencialmente como descrito patente da Organização Européia de Patentes no. 336 736 e o Pedido PCT publicado pelos depositantes, no. WO 91/15505, descrito acima. As operações de purificação específica efetuadas são descritas abaixo.

Toxina de Coqueluche (PT):

A coluna de perlite foi lavada com tampões de 50 mM

81

Tris, 50 mM Tris/ 0,5% Triton X-100 e 50 mM Tris. A fração PT foi eluída da coluna de perlite com tampão de 50 mM Tris/0,12M NaCl.

A fração de PT da cromatografia de perlite foi carregada sobre uma coluna de hidroxilapatite e a seguir lavada com tampão de 30 mM de fosfato de potássio. PT foi eluído com tampão de 75mM de fosfato de potássio/225 mM NaCl. A coluna foi lavada com 200mM de fosfato de potássio/0,6M NaCl para obter a fração de FHA que foi descartada. Glicerol foi adicionado ao PT purificado até 50% e a mistura foi armazenada a 2°C até 8°C até detoxificação, em uma semana.

Hemaglutinina filamentosa (FHA):

A fração de FHA foi eluída da coluna de perlite com 50mM Tris/0,6M NaCl. Hemaglutinina filamentosa foi purificada por cromatografia sobre hidroxilapatite. A fração de FHA da coluna de perlite foi carregada sobre uma coluna de hidroxilapatite a seguir lavada com 30 mM de fosfato de potássio contendo 0,5% Triton X-100, seguido por tampão de 30 mM de fosfato de potássio. A fração PT foi eluída com tampão de 85 mM de fosfato de potássio e descartada. A fração de FHA foi então eluída com 200 mM de fosfato de potássio/0,6M NaCl e armazenada a 2°C até 8°C até detoxificação em uma semana.

69 kDa (pertactina):

O concentrado de caldo foi diluído com água para injeção (WFI) para obter condutividade de 3 a 4 mS/cm e carregado sobre uma coluna de perlite em uma carga de 0,5 a

82/10

3,5 mg de proteína por ml de perlite. A passagem (Fração de componente de 69 kDa) foi concentrada por ultra-filtração utilizando uma membrana NMWL de 10 a 30 kDa. Sulfato de amônio foi adicionado ao concentrado de passagem até 35% ± 3% (peso/v) e a mistura resultante armazenada a 2°C até 8°C por 4 ± 2 dias ou centrifugado (7.000 x g) imediatamente. Sobrenadante em excesso foi decantado e o precipitado coletado por centrifugação (7.000x g). A pelota de 69 kDa foi armazenada congelada a -20°C até -30°C ou dissolvida em tampão de fosfato ou Tris e utilizada imediatamente.

A proteína de membrana externa de 69 kDa obtida pela precipitação de sulfato de amônio a 35% (peso/v) de passagem de perlite concentrado foi utilizada para a purificação. Sulfato de amônio (100 ± 5 g por litro) foi adicionada à fração de 69 kDa e a mistura agitada por pelo menos 2 horas a 2°C até 8°C. A mistura foi centrifugada (7.000 x g) para recuperar o sobrenadante. Sulfato de amônio (100 a 150 g por litro) foi adicionado ao sobrenadante e a mistura agitada por pelo menos 2 horas a 2°C até 8°C. A mistura foi centrifugada (7.000 x g) para recuperar a pelota, que foi dissolvida em 10 mM Tris, HCl, pH 8. A resistência iônica da solução foi ajustada ao equivalente de 10 mM Tris HCl (pH 8), contendo 15 mM de sulfato de amônio.

A proteína de 69 kDa foi aplicada a uma coluna de hidroxilapatite conectada em tandem a uma coluna Q-Sepharose. A proteína de 69 kDa foi coletada na passagem, foi lavada das colunas com 10 mM Tris, HCl (pH 8), contendo

23

15 mM de sulfato de amônio e agrupada com proteína 69 kDa na passagem. O grupo de proteína 69 kDa foi diafiltrado com 6 a 10 volumes de 10 mM de fosfato de potássio (pH 8), contendo 0,15M NaCl em uma membrana NMWL de 100 a 300 kDa. O ultra filtrado foi coletado e a proteína 69 kDa no ultra filtrado concentrado.

A proteína de 69 kDa foi permutada com solvente em 10 mM Tris HCl (pH8), e adsorvida sobre Q-Sepharose, lavada com 10 mM Tris HCl (pH 8)/5 mM de sulfato de amônio. A proteína de 69 kDa foi eluída com 50 mM de fosfato de potássio (pH 8). A proteína de 69 kDa foi diafiltrada com 6 a 10 volumes de 10 mM de fosfato de potássio (pH 8) contendo 0,15 M NaCl em uma membrana NMWL de 10 a 30 kDa. A proteína de 69 kDa foi filtrada esterilizada através de um filtro $\leq 0,22$ μ m. Este volume esterilizado foi armazenado a 2° até 8°C e a adsorção foi realizada em três meses.

Aglutinógenos fimbriais:

Os aglutinógenos foram purificados da pasta de célula após a separação do caldo. A pasta de célula foi diluída até uma fração de 0,05 volume de células em um tampão contendo 10 mM de fosfato de potássio, 150mM NaCl e 4M de uréia e foi misturada por 30 minutos. O lisado de célula foi clarificado por centrifugação (12.000 x g) a seguir concentrado e diafiltrado contra 10 mM de fosfato de potássio/150mM NaCl/0,1% Triton X-100 utilizando um filtro de membrana NMWL de 100 a 300 kDa.

O concentrado foi tratado com aquecimento a 80°C por 30 min. a seguir reclarificado por centrifugação (9.000 x

g). PEG 8000 foi adicionado ao sobrenadante clarificado a uma concentração final de $4,5\% \pm 0,2\%$ e agitado suavemente por um mínimo de 30 minutos. O precipitado resultante foi coletado por centrifugação ($17.000 \times g$) e a pelota extraída com tampão de 10 mM de fosfato de potássio/150 mM NaCl para fornecer uma solução bruta de aglutinógeno fimbrial. Os aglutinógenos fimbriais foram purificados por passagem sobre sílica PEI. A solução bruta foi feita 100 mM com relação a fosfato de potássio utilizando tampão de 1M de fosfato de potássio e passada através da coluna de sílica PEI.

A passagem das colunas foi concentrada e diafiltrada contra tampão de 10 mM de fosfato de potássio/150mM de NaCl utilizando um filtro de membrana NMWL de 100 a 300 kDa. Este volume esterilizado é armazenado a 2°C até 8°C e a adsorção realizada em três meses. A preparação de aglutinógeno fimbrial continha Agg fimbrial 2 e Agg fimbrial 3 em uma razão de peso de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2:1 e foi verificada ser substancialmente isenta de Agg 1.

Exemplo 3:

Este exemplo descreve a formação de toxóide dos antígenos de Bordetella pertussis purificados, PT e FHA.

PT, preparado em forma pura como descrito no exemplo 1, foi formado em toxóide pelo ajuste da concentração de glutaraldeído na solução PT até $0,5\% \pm 0,1\%$ e incubando a $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 4 horas. A reação foi parada pela adição de L-aspartato até $0,21 \pm 0,02\text{M}$. A mistura foi então mantida

85

em temperatura ambiente por $1 \pm 0,1$ horas e a seguir a 2°C até 8°C por 1 a 7 dias.

A mistura resultante foi diafiltrada contra tampão de 10 mM de fosfato de potássio/0,15 M NaCl/5% de glicerol em um filtro de membrana NMWL de 30kDa e a seguir esterilizado por passagem através de um filtro de membrana $\leq 0,22$ μm . Este volume esterilizado foi armazenado a 2°C até 8°C e a adsorção realizada em três meses.

A fração de FHA, preparada em forma pura como descrito no exemplo 2, foi formado em toxóide pelo ajuste da concentração de L-lisina e formaldeído até $47 \pm 5\text{mM}$ e $0,24 \pm 0,05\%$ respectivamente e incubando a 35°C até 38°C por 6 semanas. A mistura foi então diafiltrada contra 10 mM de fosfato de potássio/0,5M NaCl utilizando um filtro de membrana NMWL de 30 kDa e esterilizada pela passagem através de um filtro de membrana. Este volume esterilizado foi armazenado a 2°C até 8°C e a adsorção realizada em três meses.

Exemplo 4:

Este Exemplo descreve a adsorção dos antígenos de *Bordetella pertussis* purificados.

Para a adsorção individual de PT, FHA, Agg e 69 kDa sobre fosfato de alumínio (alume), uma solução de estoque de fosfato de alumínio foi preparada até uma concentração de $18,75 \pm 1$ mg/ml. Um vaso adequado foi preparado e qualquer um dos antígenos assepticamente dispensado no vaso. 2-fenoxietanol foi assepticamente adicionado para fornecer uma concentração final de $0,6\% \pm 0,1\%$ v/v e

86

agitado até ficar homogêneo. O volume apropriado de fosfato de alumínio foi assepticamente adicionado ao vaso. Um volume apropriado de água destilada esterilizada foi adicionado para levar a concentração final até 3 mg de fosfato de alumínio/ml. Os recipientes foram vedados e rotulados e deixados agitar em temperatura ambiente por 4 dias. O vaso foi então armazenado esperando formulação final.

Exemplo 5:

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

Os antígenos *B. pertussis* preparados como descrito nos Exemplos anteriores foram formulados com toxóides de difteria e tétano para fornecer vacinas de coqueluche de componente (CP) como descrito abaixo.

Os componentes de coqueluche foram produzidos de *Bordetella pertussis* crescida em cultura submersa como descrito em detalhe nos Exemplos 1 a 4 acima. Após término de crescimento, o caldo de cultura e as células bacterianas foram separadas por centrifugação. Cada antígeno foi purificado individualmente. Toxina de coqueluche (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) foram purificados do caldo por cromatografia seqüencial sobre perlite e hidroxilapatite. PT foi detoxificado com glutaraldeído e qualquer PT residual (aproximadamente 1%) presente na fração de FHA foi detoxificado com formaldeído. Aglutinógenos fimbriais (2+3) (AGG) foram preparados das

28

células bacterianas. As células foram rompidas com uréia e tratadas a calor, e os aglutinógenos fimbriais foram purificados por precipitação com polietileno glicol e cromatografia sobre sílica de polietilenoimina. O componente de proteína de 69 kDa (pertactina) foi isolado da passagem da etapa de cromatografia de perlite (Exemplo 2) por precipitação de sulfato de amônio, e purificado por cromatografia seqüencial sobre hidroxilapatite e Q-Sepharose. Todos os componentes foram esterilizados por filtração através de um filtro de membrana de 0,22 um.

Toxóide de difteria foi preparado de *Corynebacterium diphtheriae* cultivada em cultura submersa por métodos padrão. A produção de Toxóide de Difteria é dividido em cinco estágios a saber: manutenção da semente de trabalho, crescimento de *Corynebacterium diphtheriae*, colheita da toxina de Difteria, detoxificação da Toxina de difteria e concentração de Toxóide de Difteria.

Preparação de Toxóide de Difteria:

(I) Semente de Trabalho

A cepa de *Corynebacterium diphtheriae* foi mantida como um lote de semente seca por congelamento. A semente reconstituída foi cultivada em inclinações Loeffler por 18 a 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e a seguir transferida para frascos de meio de difteria. A cultura foi então testada em relação à pureza e teor de Lf. A semente restante foi utilizada para inocular um fermentador.

(II) Crescimento de *Corynebacterium diphtheriae*

A cultura foi incubada a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e agitada no

fermentador. Quantidades predeterminadas de sulfato ferroso, cloreto de cálcio e soluções de fosfato foram adicionadas à cultura. As quantidades efetivas de cada solução (fosfato, sulfato ferroso, cloreto de cálcio) foram
5 determinadas experimentalmente para cada lote de meio. Os níveis escolhidos são aqueles que forneceram o teor mais elevado de Lf. Ao término do ciclo de crescimento (30 a 50 horas), as culturas foram amostradas em relação à pureza e teor de Lf.

10 O pH foi ajustado com bicarbonato de sódio, e a cultura inativada com 0,4% de tolueno por 1 hora em uma temperatura mantida de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Um teste de esterilidade foi então realizado para confirmar a ausência de *C.diphtheriae* vivo.

15 (III) Colheita de toxina de difteria

As culturas tratadas com tolueno de um ou vários fermentadores foram agrupadas em um grande tanque. Aproximadamente 0,12% de bicarbonato de sódio, 0,25% de carvão, e 23% de sulfato de amônio foram adicionados, e o
20 pH foi testado.

A mistura foi agitada por aproximadamente 30 minutos. Terra diatomácea foi adicionada e a mistura bombeada para dentro de um filtro de profundidade. O filtrado foi recirculado até ficar claro, a seguir coletado, e amostrado
25 para teste de teor de Lf. Sulfato de amônio adicional foi adicionado ao filtrado para fornecer uma concentração de 40%. Terra diatomácea também foi adicionada. Esta mistura foi mantida por 3 a 4 dias a 2°C a 8°C para permitir que o

precipitado assente. Toxina precipitada foi coletada e dissolvida em 0,9% de solução salina. A terra diatomácea foi removida por filtração e a toxina dialisada contra 0,9% de solução salina, para remover o sulfato de amônio. Toxina dialisada foi agrupada e amostrada para teste de pureza e teor de Lf.

(IV) Detoxificação de toxina de difteria

A detoxificação ocorre imediatamente após diálise. Para detoxificação, a toxina foi diluída de modo que a solução final continha:

- a) toxina de difteria a $1000 \pm 10\%$ Lf/ml.
- b) 0,5% de bicarbonato de sódio
- c) 0,5% formalina
- d) 0,9% peso/v de monohidrocloreto de L-lisina

A solução foi trazida até o volume com solução salina e o pH ajustado para $7,6 \pm 0,1$.

Toxóide foi filtrado através de chumaços de filtro de terra diatomácea e/ou um pré-filtro de membrana e filtro de membrana de 0,2 um para dentro do vaso de coleta e incubado por 5 a 7 semanas a 34°C . Uma amostra foi retirada para teste de toxicidade.

(V) Concentração de toxóide purificado

Os toxóides foram agrupados, a seguir concentrados por ultrafiltração, e coletados em um recipiente adequado. As amostras foram tiradas para teste de pureza e teor de Lf. O conservador (2-fenoxietanol) foi adicionado para fornecer uma concentração final de 0,375% e o pH ajustado para 6,6 até 7,6.

O toxóide foi esterilizado por filtração através de um pré-filtro e um filtro de membrana de 0,2 um (ou equivalente) e coletado. O toxóide esterilizado foi então amostrado para irreversibilidade de teor Lf de toxóide, teor de conservador, pureza (teor de nitrogênio), esterilidade e teste de toxicidade. O toxóide concentrado esterilizado foi armazenado a 2°C até 8°C até a formulação final.

Preparação de toxóide de tétano:

Toxóide de tétano (T) foi preparado de *Clostridium tetani* cultivado em cultura submersa.

A produção de Toxóide de tétano pode ser dividida em cinco estágios a saber: manutenção da semente de trabalho, crescimento de *Clostridium tetani*, colheita de Toxina de tétano, detoxificação de toxina de tétano e purificação de toxóide de tétano.

(I) Semente de trabalho:

A cepa de *Clostridium tetani* utilizada na produção de toxina de tétano para a conversão em toxóide de tétano foi mantida na forma liofilizada em um lote de semente. A semente foi inoculada em meio de tioglicolato e deixada crescer por aproximadamente 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Uma amostra foi tirada para teste de pureza de cultura.

(II) Crescimento de *Clostridium tetani*

O meio de tétano foi dispensado em um fermentador, tratado com aquecimento e resfriamento. O fermentador foi então semeado e a cultura deixada crescer por 4 a 9 dias a $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Uma amostra foi retirada para

verificação de pureza da cultura, e teste de teor de Lf.

(III) Colheita de toxina de tétano

A toxina foi separada por filtração através de chumaços de terra diatomácea de celulose, e a toxina clarificada a seguir esterilizada por filtro utilizando filtros de membrana. As amostras foram tiradas para teste de esterilidade e teor Lf. A toxina foi concentrada por ultrafiltração, utilizando um tamanho de poro de 30.000 daltons.

(IV) Detoxificação de toxina de tétano

A toxina foi amostrada para teste de teor Lf antes da detoxificação. A toxina concentrada (475 a 525 Lf/ml) foi detoxificada pela adição de 0,5% peso/v de bicarbonato de sódio, 0,3% v/v formalina e 0,9% peso/v de monohidrocloreto de L-lisina e trazida até o volume com solução salina. O pH foi ajustado até $7,5 \pm 0,1$ e a mistura incubada a 37°C por 20 a 30 dias. As amostras foram tiradas para teste de toxicidade e esterilidade.

(V) Purificação de toxóide

O toxóide concentrado foi esterilizado através de pré-filtros, seguido por filtros de membrana de 0,2 um. As amostras foram tiradas para teste de teor Lf e esterilidade.

A concentração ideal de sulfato de amônio foi baseada em uma curva "S" de fracionamento determinada das amostras do toxóide. A primeira concentração foi adicionada ao toxóide (diluída até 1900-2100 Lf/ml). A mistura foi mantida por pelo menos 1 hora a 20°C até 25°C e o

sobrenadante coletado e o precipitado contendo a fração com elevado peso molecular, descartado.

Uma segunda concentração de sulfato de amônio foi adicionada ao sobrenadante para o segundo fracionamento remover as impurezas de baixo peso molecular. A mistura foi mantida por pelo menos 2 horas a 20°C até 25°C e a seguir podia ser mantida a 2°C até 8°C por um máximo de três dias. O precipitado, que representa o toxóide purificado, foi coletado por centrifugação e filtração.

Sulfato de amônio foi removido do toxóide purificado por diafiltração, utilizando membranas de ultrafiltração Amicon (ou equivalente) com PBS até que não se pôde detectar mais sulfato de amônio na solução de toxóide. O pH foi ajustado para 6,6 a 7,6, e 2-fenoxietanol adicionado para fornecer uma concentração final de 0,375%. O toxóide foi esterilizado por filtração de membrana, e as amostras são tiradas para teste (irreversibilidade de toxóide, teor Lf, pH, teor de conservador, pureza, esterilidade e toxicidade).

Formulação de vacina multivalente

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

10 ug de toxóide de coqueluche (PT)

5 ug de hemaglutinina filamentosa (FHA)

5 ug de aglutinógenos fimbriais 2 e 3 (FIMB)

3 ug 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
5 0,6% de 2-fenoxietanol como conservador

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

10 10 ug de toxóide de coqueluche (PT)
5 ug de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 ug de aglutinógenos fimbriais 2 e 3 (FIMB)
15 15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano
1,5 mg de fosfato de alumínio
0,6% de 2-fenoxietanol como conservador

Outra formulação de vacina de Coqueluche de componente combinada com toxóides de tétano e difteria 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 20 ug de toxóide de coqueluche (PT)
20 ug de hemaglutinina filamentosa (FHA)
5 ug de aglutinógenos fimbriais 2 e 3 (FIMB)
3 ug de proteína de membrana externa de 69 kDa
25 15 Lf de toxóide de difteria
5 Lf de toxóide de tétano
1,5 mg de fosfato de alumínio
0,6% de 2-fenoxietanol como conservador

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

- 5 20 ug de toxóide de coqueluche (PT)
- 10 ug de hemaglutinina filamentosa (FHA)
- 10 ug de aglutinógenos fimbriais 2 e 3 (FIMB)
- 6 ug de proteína de membrana externa de 69 kDa
- 15 Lf de toxóide de difteria
- 10 5 Lf de toxóide de tétano
- 1,5 mg de fosfato de alumínio
- 0,6% de 2-fenoxietanol como conservador

Exemplo 6:

Este exemplo descreve a avaliação clínica de vacinas de Coqueluche acelulares de componente.

Estudos em adultos:

Estudos em adultos e crianças com idade de 16 a 20 meses indicaram que as vacinas de multi-componentes contendo aglutinógenos fimbriais são seguras e imunogênicas (Tabela 2).

Um estudo clínico de Fase I foi realizado em crianças com 17 e 18 meses em Calgary, Alberta com a vacina de Coqueluche de cinco componentes (CP_{10/5/5/3}DT) e a reação adversa reportada. Trinta e três crianças receberam a vacina e adicionalmente 35 receberam a mesma vacina sem o componente de proteína 69 kDa.

As reações locais foram raras. As reações adversas sistêmicas, consistindo principalmente de irritabilidade

estavam presentes aproximadamente na metade de participantes do estudo, independente de qual vacina foi dada. Aumentos significativos de anticorpo foram medidos para anti-PT, anti-FHA, aglutinógenos anti-fimbriais e anticorpos IgG anti-69 kDa, por imunoensaio de enzima e anticorpos anti-PT (no teste de neutralização de célula CHO. Nenhuma diferença em resposta de anticorpo foi detectada em crianças que receberam os quatro componentes (CP_{10/5/5}DT) ou cinco componentes (CP_{10/5/5/3}DT) exceto no anticorpo anti-69 kDa. As crianças que receberam a vacina de cinco componentes contendo a proteína 69 kDa tiveram um nível de anticorpo anti-69 kDa pós-imunização significativamente mais elevado.

Um estudo de resposta de dose foi feito com a vacina de 4 componentes em Winnipeg, Manitoba, Canadá. Duas formulações de vacina de componentes foram utilizadas: CP_{10/5/5/3}DT e CP_{20/10/10/6}DT. Uma vacina DPT de célula integral também foi incluída como controle.

Este estudo foi um estudo duplo-cego em 91, com bebês de 17 a 18 meses de idade na época de sua dose de reforço para coqueluche. Tanto CP_{10/5/5/3}DT como CP_{20/10/10/6}DT foram bem tolerados por estas crianças. Nenhuma diferença foi demonstrada no número de crianças que tiveram qualquer reação local, ou reações sistêmicas após qualquer uma das vacinas de componente. Em contraste, um número significativamente maior de crianças que receberam a vacina de célula integral tiveram reações locais e sistêmicas do que aquelas que receberam as vacinas de componente

CP_{20/10/10/6}DT.

Estudos em bebês:

Fase II:

Um estudo foi realizado utilizando a vacina CP_{10/5/5/3}DT em Calgary, Alberta, e British Columbia, Canadá. Neste estudo, 432 bebês receberam a vacina de coqueluche de componente ou a vacina de controle de célula integral DPT com 2, 4 e 6 meses de idade. A vacina CP_{10/5/5/3}DT foi bem tolerada por estes bebês. As reações locais eram menos comuns com a vacina de componente do que a vacina de célula integral após cada dose.

Uma resposta de anticorpo significativa a todos os antígenos foi demonstrada após vacinação com a vacina de coqueluche de componente. Receptores da vacina de célula integral tiveram uma resposta de anticorpo vigorosa a aglutinógenos fimbriais D e T. Em sete meses, 82% a 89% de recipientes de vacina de componente e 92% de receptores de vacina de célula integral tiveram um aumento de quatro vezes ou maior aumento em título de anticorpo para aglutinógenos fimbriais. Em contraste, a resposta de anticorpo a FHA foi 75% a 78% em receptores. Um aumento de quatro vezes em anticorpo anti-69 kDa foi visto em 90% a 93% de vacinas de componente e 75% de receptores de célula integral. Um aumento de quatro vezes em anticorpo contra PT por imunoensaio de enzima foi visto em 40% a 49% de vacinas de componente e 32% de vacinas de célula integral; um aumento de quatro vezes em anticorpo PT por neutralização CHO foi encontrado em 55% a 69% de vacinas de componente e

6% de vacinas de célula integral. (Tabela 2)

Fase IIB:

As vacinas CP_{20/20/5/3}DT e CP_{10/10/5/3}DT foram avaliadas em um estudo cego randomizado contra um controle D₁₅PT com um teor inferior de difteria de 15 Lf em comparação com uma formulação de 25 Lf de 100 bebês com 2, 4 e 6 meses de idade. Nenhuma diferença em taxas de reações adversas foi detectada entre as duas formulações de componentes; ambas foram significativamente menos reatogênico do que o controle de célula integral. Títulos mais elevados de anticorpo contra PT por imunoensaio de enzima e neutralização de CHO e FHA foram obtidos em receptores da vacina CP_{20/20/5/3}DT com teor aumentado de antígeno. Com 7 meses, o título médio geométrico anti-FHA foi 95,0 em receptores de CP_{20/20/5/3}DT, 45,2 em receptores CP_{10/5/5/3}DT foram apenas 8,9 em receptores D₁₅PT. Títulos anti-PT foram 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 Coqueluche de componente combinada com toxóides de difteria e tétano adsorvidos, com teor aumentado de antígeno, era segura e imunogênica em bebês e que o teor aumentado de antígeno aumentou a resposta imune aos antígenos preparados (PT e FHA) sem aumento em reatogenicidade.

NIAID, FASE II, Experimento comparativo nos Estados Unidos da América.:

Um estudo de fase II foi realizado nos Estados Unidos sob os auspícios do National Institute of Allergy and

Infectious Diseases (NIAID) como um prelúdio para um experimento de eficácia em grande escala de vacinas de coqueluche acelulares. Uma vacina de coqueluche de componente da invenção em combinação com toxóides de tétano e difteria adsorvidos (CP_{10/5/5/3}DT) foi incluída naquele experimento juntamente com 12 outras vacinas acelulares e 2 vacinas de célula integral. Os resultados de segurança foram reportados em 137 crianças imunizadas com 2, 4 e 6 meses de idade com a vacina de componente CP_{10/5/5/3}DT.

Como visto em estudos anteriores, a vacina de componente foi verificada ser segura, de baixa reatogenicidade e ser bem tolerada por vacinas.

Em 7 meses, anticorpo anti-PT, anticorpo anti-FHA, anticorpo anti-69 kDa e anticorpo de aglutinógenos anti-fimbriais foram todos mais elevados do que ou equivalentes a níveis obtidos após as vacinas de célula integral (Tabela 2). Um estudo cego duplo foi realizado no qual crianças foram aleatoriamente alocadas para receberem a formulação de vacina CP_{20/20/5/3}DT ou CP_{10/5/5/3}DT. Um total de 2050 bebês foram registrados nos Estados Unidos e no Canadá; 1961 bebês completaram o estudo. As duas formulações de vacina eram seguras, de baixa reatogenicidade e imunogênicas nestes bebês. Imunogenicidade foi avaliada em um subgrupo de 292. Um aumento de anticorpo foi causado para todos os antígenos contidos na vacina pelas duas formulações de vacina. A formulação CP_{20/20/5/3}DT induziu títulos de anticorpo mais elevados contra FHA porém não PT. A formulação CP_{10/5/5/3}DT causou títulos mais elevados contra

fímbrias e títulos de aglutinógenos mais elevados.

Um estudo adicional de segurança e imunogenicidade foi conduzido na França. O projeto do estudo foi similar ao estudo norte-americano, descrito acima, exceto que as vacinas foram administradas com 2, 3 e 4 meses de idade. Reações locais e sistêmicas foram geralmente menores. No geral, a vacina foi bem aceita pelos participantes do estudo francês utilizando este regime de administração.

Experimento de eficácia controlado por placebo de duas vacinas de coqueluche acelulares e de uma vacina de célula integral em 10.000 bebês

Após os resultados do experimento comparativo dos Estados Unidos da América de Fase II do NIAID, uma vacina acelular de dois componentes e uma de cinco componentes foram selecionadas para um experimento de eficácia controlada por placebo, randomizado-duplo, controlado, em multi-centro. O experimento clínico foi realizado na Suécia, onde há elevada incidência de coqueluche. A vacina de dois componentes continha gliceraldeído e PT inativado por formalina (25 ug), FHA tratada por formalina (25 ug) e toxóide de difteria 17 Lf e toxóide de tétano 10 Lf. A vacina de coqueluche de cinco componentes era CP_{10/5/5/3}DT. Para o experimento, dez mil bebês, representando aproximadamente metade dos bebês deste grupo de idade na Suécia, foram recrutados em 14 locais de estudo geograficamente definidos pelo uso de registro de nascimento.

As crianças nascidas em janeiro e fevereiro de 1992



foram randomizadas em um experimento de 3 braços. Após consentimento dos pais, dois terços dos bebês receberam uma das duas preparações de coqueluche difteria-tétano-acelular com dois, quatro e seis meses de idade. O grupo de controle recebeu apenas DT. Em maio de 1992, uma vacina DTP de célula integral comercializada licenciada nos E.U.A. foi introduzida e as crianças nascidas de março até dezembro de 1992 foram randomizadas em um experimento de 4 braços. Após consentimento dos pais, três quartos dos bebês receberam uma dentre três preparações de DTP com dois, quatro e seis meses de idade. O grupo de controle recebeu apenas DT.

Cada vacina foi administrada a aproximadamente 2.500 crianças. As vacinas foram administradas em três doses. A primeira dose foi dada com 2 meses de idade e não posterior a 3 meses de idade. Doses subseqüentes foram dadas com intervalos de 8 semanas. As vacinas foram dadas por injeção intramuscular.

As crianças e seus lares foram acompanhados por 30 meses. Caso houvesse suspeita de coqueluche, dados clínicos eram coletados, e a verificação laboratorial procurada por aspirados nasais para cultura bacteriológica e diagnóstico de reação de cadeia de polimerase (PCR). Amostras de sangue de pacientes em estado agudo e convalescente foram coletadas para diagnóstico sorológico.

Antes deste estudo, a extensão de pertactina proporcionada por vacinas de coqueluche de componente da presente invenção em uma população humana em risco (particularmente neonatos) era desconhecida. Em particular,

a contribuição dos vários componentes de *Bordetella* e sua presença em vacinas de coqueluche em quantidades relativas selecionadas para eficácia das vacinas não era conhecida.

5 O principal objetivo do experimento foi calcular a capacidade das vacinas de coqueluche acelulares e vacina de célula integral em proteger contra coqueluche típica como comparado com placebo.

10 Um ponto final secundário foi explorar a eficácia da vacina contra infecção confirmada de coqueluche de gravidade variada.

A eficácia da vacina é definida como a redução em percentagem na probabilidade de contrair coqueluche dentre os receptores de vacina em relação às crianças não vacinadas.

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

20 A probabilidade de contrair coqueluche, também chamada a taxa de ataque, pode ser calculada em diferentes modos. Nos cálculos do tamanho de amostra, a probabilidade de contrair coqueluche em um dado grupo de estudo é calculada pelo quociente entre o número de crianças com coqueluche e as crianças que permanecem no grupo de estudo ao término do acompanhamento do estudo.

25 A eficácia da vacina de componente CP_{10/5/5/3}DT neste experimento em evitar coqueluche típica é mostrada na Tabela 4 e foi de aproximadamente 85%. No mesmo experimento, uma vacina acelular de coqueluche de dois

componentes contendo apenas PT e FHA foi aproximadamente 58% eficaz e uma vacina de célula integral foi aproximadamente 48% eficaz. O CP_{10/5/5/c}DT também foi eficaz para prevenção de coqueluche branda em uma eficácia estimada de aproximadamente 77%.

Exemplo 7:

Este exemplo descreve a formulação e imunogenicidade de vacina de combinação multivalente contendo um polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae*.

Preparação de componente PRP-T

O polissacarídeo capsular (PRP) de *H. influenzae* foi purificado e conjugado com toxóide de tétano no seguinte modo. De ampolas liofilizadas de lote de semente de trabalho de *H. influenzae*, três pré-culturas sucessivas foram realizadas. A primeira pré-cultura foi em meio sólido. Ampolas foram inoculadas sobre pratos de ágar de carvão + sangue em ebulição (10% de sangue de cavalo aquecido por 15 min. a 80°C) e incubados por 20 ± 4 horas em 36°C a 37°C sob CO₂. A segunda pré-cultura estava em meio líquido por 8 horas a 37°C. O meio líquido tinha a seguinte composição por litro:

1.	ácidos casamino Difco	10g
	fosfato de monossódio 2H ₂ O	2,03 g
	fosfato de dissódio 12H ₂ O	31,14 g
	lactato de sódio (60% solução)	1,5 mL
	L-cistina	0,07 g
	L-triptofans	0,02 g
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,02 g

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

1 g

 $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

0,4 g

anti-espuma Dow Corning M.S.A

a 25% em óleo de parafina

0,15 ml

5

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 - dinucleotídeo de adenina esterilizado por filtro.

10

3. extrato de levedura Difog

5 g

esterilizado por filtro.

15

A terceira pré-cultura estava em meio líquido com agitação por 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 por 12 a 14 horas. A cultura foi coletada em um tanque refrigerado. Formalina foi adicionada a uma concentração de 10 ml/litro. A cultura foi mantida, com agitação suave, a + 4°C por 2 - 24 horas e a seguir centrifugada. A formalina adicionada não foi destinada a inativar completamente a bactéria porém deter crescimento e inibir metabolismo. Esta adição reduziu a lise de célula com contaminação conseqüente com componentes intracelulares. A duração desta fixação foi entre 2 e 24 horas e tipicamente a cultura é deixada durante a noite antes de ser centrifugada. O sobrenadante contendo o polissacarídeo foi colhido e a pelota bacteriana foi descartada. O processo de purificação foi realizado geralmente em um ambiente frio ou em condições tais que a

20

25

adp

temperatura dos produtos e reagentes é menor do que ou
igual a + 10°C exceto para a etapa de purificação de fenol
que foi realizada em temperatura ambiente. Após
centrifugação da cultura, o sobrenadante da cultura foi
5 concentrado. O polissacarídeo capsular foi precipitado do
concentrado resultado pela adição de centrímida para
fornecer uma concentração final de 5% peso/V. Centrímida
precipitou PS do fluido concentrado (SNF). Um pouco de
proteína, ácido nucléico e lipopolissacarídeo (LPS) também
10 foram co-precipitados. Os precipitados foram coletados por
centrifugação deixando alguns outros contaminantes e
proteína para trás no SNF. A pelota resultante foi coletada
por centrifugação e armazenada a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

As pelotas foram suspensas novamente em 0,3 M de
15 solução NaCl e a suspensão centrifugada novamente. NaCl
dissociou seletivamente complexos de centrímida de
polissacarídeo. Alguns contaminantes (ácido nucléico, LPS,
proteína) também foram dissociados no processo. Ao
sobrenadante foi adicionado etanol absoluto pré-resfriado
20 até uma concentração final de 60%. O precipitado resultante
foi coletado por centrifugação e lavado com etanol
absoluto, frio. O precipitado foi seco a vácuo a 0-4°C, e
era o produto intermediário. O produto intermediário foi
dissolvido em tampão de acetato de sódio e com fenol em
25 temperatura ambiente. A fase aquosa foi coletada por
centrifugação contínua. A extração de fenol e centrifugação
pode ser repetida várias vezes e a fase aquosa foi
dialisada e diafiltrada. O polissacarídeo capsular da

208

solução diafiltrada foi precipitada pela adição de etanol pré-resfriado até uma concentração final de 60% na presença de NaCl 0,3 M. O precipitado foi coletado por centrifugação, lavado com etanol absoluto pré-resfriado, acetona e éter e seco a vácuo a 4°C. O precipitado seco foi então triturado até um pó fino sob baixa umidade e este produto constitui o polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b purificado.

O polissacarídeo purificado foi dissolvido em água para obter 5 mg de polissacarídeo por ml de solução, e o pH ajustado para $10,8 \pm 0,2$ com NaOH. Brometo de cianogênio como uma solução em água foi adicionado nas proporções de 0,5 mg CNBr/mg de polissacarídeo. O pH da mistura de reação foi mantido com NaOH a $10,8 \pm 0,2$ por 35 a 40 minutos a $23 \pm 3^\circ\text{C}$. O pH foi reduzido para pH 9 pela adição de HCl. Diidrazida de ácido adapico foi adicionado para fornecer uma concentração final de 3,5 mg ADH/mg de polissacarídeo e o pH ajustado para 8,5. A mistura de reação foi incubada a $23 \pm 3^\circ\text{C}$ por 15 minutos (pH mantido em 8,5) e a seguir a solução foi incubada durante a noite a $+4^\circ\text{C}$, com agitação suave. A mistura de reação foi dialisada contra solução NaCl e a seguir concentrada. A solução foi então filtrada através de um filtro de 0,45u e congelada a $\leq -40^\circ\text{C}$. Isto constitui o AH-polissacarídeo e foi armazenado a uma temperatura $\leq -40^\circ\text{C}$.

Para produzir o componente de toxina de tétano, uma cepa de *Clostridium tetani* foi inoculada em uma série de tubos contendo 10 ml de meio Rosenow ou meio de

106

tioglicolato. O meio Rosenow tem a seguinte composição:

Fórmula (em gramas por litro de água destilada)

	Peptona	10
	extrato de carne	3
5	glicose	2
	cloreto de sódio	5
	indicador "Andrade"	
	(5% de ácido Fuchsin)	10 mL
	mármore branco	1 peça
10	cérebro	1 peça

O meio, preparado imediatamente antes do uso de produtos prontos para uso, foi enchido em tubos e esterilizado a 120°C por 20 minutos.

Uma garrafa de 5 litros contendo 3 litros de meio de "Massachusetts" foi inoculado com *C.tetani* e incubado por 16 a 18 horas a 35°C $\pm$ 1°C por 16 horas. O conteúdo foi então transferido para uma garrafa de 20 litros contendo 15 litros de meio de "Massachusetts" esterilizado e incubado 8 horas a 35°C $\pm$ 1°C. Cada garrafa foi utilizada para inocular um fermentador contendo 582 litros de meio de "Massachusetts" e incubado a 35°C por 5 a 6 dias com aeração. Os fermentadores foram resfriados e à cultura foi adicionado cloreto de sódio 12 kg, citrato de trissódio 8 kg. A agitação foi mantida por um dia a seguir parada e este processo permite extração da toxina residual da bactéria ao término da cultura. A toxina foi clarificada por filtração ou por passagem através de uma centrífuga contínua.

O sobrenadante de 1200 l de cultura foi concentrado por ultra filtração e a toxina concentrada diafiltrada contra 0,07 M de solução de fosfato de dissódio pH 8,2. O volume final foi ajustado para 500 Lf/m.

5 Uma precipitação dupla com sulfato de amônio foi realizada para obter a toxina de tétano purificado. Desse modo, sulfato de amônio e 10 g de carvão são lentamente adicionados por litro da toxina diafiltrada previamente obtida. Após 15 a 24 horas de incubação a +4°C, a toxina
10 foi filtrada em cartuchos para eliminar o precipitado. seguir, uma quantidade de sulfato de amônio suficiente para fazer 320 gm/l foi lentamente adicionada por litro do sobrenadante previamente obtido. Após aproximadamente 48 horas a +4°C a pelota foi coletada por centrifugação e
15 dissolvida em uma solução de fosfato de dissódio 0,05 M pH 8,2. A solução foi diafiltrada contra 0,05 M de solução de fosfato de dissódio pH 8,2 e ajustada para 300 Lf/ml. A solução foi então esterilizada por filtro. 7,5 u moles (0,225%) de formaldeído foram adicionados por ml da solução
20 de toxina. A detoxificação foi obtida após incubação por 24 dias a +37°C incluindo períodos intermediários a +4°C e 22°C. A esterilização por filtração (0,22 u) foi realizada para obter o toxóide de tétano. O toxóide de tétano foi dialisado e concentrado contra NaCl utilizando uma membrana
25 tendo um corte de peso molecular ≤ 50.000 . A proteína concentrada foi então assepticamente filtrada e armazenada a +4°C.

Quantidades iguais de AH-polissacarídeo e toxóide de

tétano ($\pm 20\%$) foram misturadas com 0,05 M NaCl para fornecer uma concentração de 7,5 mg de polissacarídeo por ml. O pH da solução foi ajustado para pH 5,7 $\pm$ 0,2 com HCl e 1-etila 3 - (3 dimetil aminopropila) carbodiimida (EDAC) adicionado para fornecer uma concentração final de 19,17 mg EDAC/ml de mistura de reação. Os grupos de carboxila da proteína de tétano são ativados por ligação a EDAC. Sob as condições levemente ácidas da reação, segue uma reação de condensação na qual o AH-PS e a proteína de tétano ativada por EDAC se torna covalentemente ligada. A mistura foi incubada em pH constante (5,7) por 60 minutos a $+ 4^{\circ}\text{C}$, e a seguir o pH ajustado para pH 6,9 $\pm$ 0,2 com NaOH e a mistura de reação dialisada contra NaCl a $+ 4^{\circ}\text{C}$. O conjugado foi purificado por centrifugação de zona em um gradiente de sacarose (4% a 60%) para eliminar EDAC, polissacarídeo-AH livre, proteína de tétano livre, e conjugado de baixo peso molecular. À fração contendo o conjugado de polissacarídeo foi então adicionada água isenta de pirogênio, sacarose, tampão Tris-HCl para obter uma solução de conjugado da seguinte composição:

sacarose 8,5 % peso/V $\pm$ 0,5%

conc. de polissacarídeo aproximadamente 200 ug/ml

tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 $\pm$ 0,5.

A solução foi então filtrada assepticamente utilizando um filtro de 0,2 μ e armazenada a -40°C .

O volume de conjugado de polissacarídeo Haemophilus influenzae tipo b foi diluído sob condições esterilizadas com diluente para obter a composição final:

Tampão concentrado de conjugado de polissacarídeo

Haemophilus tipo b 200 mg de polissacarídeo

tampão Tris-HCl 200 mM

a pH 7,2 a 10 mM

5 sacarose a 850 g

água para injeção 10 L

O volume final foi enchido em vias e liofilizado. (A vacina liofilizada foi reconstituída com 0,5 ml ou 0,4% NaCl para uso).

10 Formulação

Duas formulações da vacina de componente multivalente (APDT) foram testadas. A primeira (APDT-baixo) continha 10 ug de toxóide de coqueluche (PT), 5 ug de hemaglutinina filamentosa (FHA), 5 ug de fímbrias 2 e 3 ug de proteína 69 K (69K) por dose de 0,5 ml (CLÁSSICA). A segunda formulação (APDT-elevado) continha duas vezes a quantidade de PT (20 ug) e quantidades idênticas de FIM e 69K (Híbrido). As duas formulações continham 15 Limite de floculação (Lf) de toxóide de difteria, 5 Lf de toxóide de tétano, 1,5 mg de fosfato de alumínio como adjuvante e 0,6% de 2-fenoxietanol como conservador. A vacina de conjugado de toxóide de tétano-Hib (PRPT) foi produzida, no modo descrito acima, por Connaught Laboratories Inc. (Swiftwater, E.U.A.).

População

25 Crianças saudáveis com 17 a 21 meses de idade que tinham sido imunizadas com três doses de APDT-baixo ou PRPT como injeções separadas com 2, 4 e 6 meses de idade em um experimento clínico prévio foram recrutadas no estudo. Após

consentimento por escrito, informado, as crianças foram alocadas por uma lista de bloco equilibrado gerada por computador de números aleatórios para receber PRT-T como uma injeção separada no mesmo dia, como uma injeção separada com o PRP-T dado um mês após a vacina APDT, ou como uma única injeção (PRP-T liofilizado reconstituído em APDT). A formulação de APDT (elevada ou baixa) para cada criança permaneceu igual como tinha sido dada nas três primeiras doses (razão de alocação 6:1 APDT-elevada; APDT-baixa). As vacinas foram dadas i.m. com uma agulha de 25 mm no músculo deltóide do braço ou o músculo vasto lateral da coxa se o deltóide não tivesse massa suficiente. Quando uma segunda injeção era necessária para PRPT, o membro oposto era injetado.

Monitoração laboratorial e clínica

Os participantes foram monitorados em relação a reações adversas locais e sistêmicas imediatamente após a imunização e pelos pais durante 72 horas após imunização. Os dados foram coletados através de uma entrevista por telefone estruturada em 24 e 72 horas. A temperatura do corpo foi medida pelo menos uma vez por dia ou sempre que os pais achassem que a criança estava febril. Sensibilidade e reações sistêmicas (irritabilidade, atividade diminuída, alimentação diminuída) foram classificadas como branda, moderada ou severa de acordo com critérios preestabelecidos pelos quais o pai selecionava uma gravidade com base em exemplos estruturados. Reações locais medidas foram classificadas por seu tamanho e choro prolongado por sua

duração.

Amostras de sangue foram coletadas por venopuntura ou por picada do dedo antes de e 28 dias após imunização; em crianças que receberam a injeção PRP-T (portanto, 2 meses após APDT). Anticorpos ao polissacarídeo capsular de Hib (PRP) foram medidos por RIA. Anticorpos IgG a PT foram medidos por ELA e anticorpo de neutralização-PT por neutralização de citotoxicidade de célula de ovário de hamster Chinês (CHO). Anticorpos IgG anti-FHA, anti-FIM, e anti-69K foram medidos por EIA; unitage foi calculada utilizando o antisoro de referência de FDA US (#3). As aglutininas de coqueluche também foram medidas. Antitoxina de difteria foi medida por ensaio de microneutralização e antitoxina de tétano por EIA. Títulos de anticorpo foram expressos como títulos de meio geométrico; amostras de soro com títulos menores do que o limite de detecção de teste foram atribuídos um valor de metade do limite de detecção inferior para a finalidade de cálculos estatísticos.

Análise estatística

Reações adversas foram analisadas após agrupamento por importância clínica. Taxas de reações adversas foram comparadas por estimativas Mantel-Haneszel de risco relativo utilizando formulação de vacina e centro como as variáveis de estratificação. Estimativas de ponto e 95% CI do RR foram calculados em cada caso. CI que não incluem 1,00 são estatisticamente significativas.

Títulos de anticorpo de média geométrica e 95% CI foram computados para o título de anticorpo para cada

antígeno de vacina pré- e após imunização. Títulos de registro médio foram comparados por análise de variância de três fatores. A proporção de pessoas obtendo níveis pré-especificados em cada grupo foi comparada por regressão logística. Nenhum ajuste foi feito para múltiplas comparações.

Um total de 545 crianças (44% do sexo feminino) foram registradas no estudo, 74% daquelas que tinham completado o estudo de série de bebê. A proporção de participantes neste estudo que tinham recebido as duas formulações permaneceu 6:1 (468 APDT-elevado, 77 APDT-baixo). A idade média era de 18,9 meses (faixa de 17-21 meses); todas exceto 3 crianças (99,4%) completaram o estudo.

Reações adversas

As taxas de reações adversas não diferiram em grupos imunizados com APDT-elevado ou APDT-baixo; as taxas também foram similares se as imunizações foram dadas separadamente em uma visita, em visitas separadas, ou em uma única injeção combinada.

Resposta de anticorpo

Antes da imunização, os níveis de anticorpo contra todos os antígenos exceto FHA eram similares em crianças que tinham recebido APDT-elevado ou APDT-baixo em suas três primeiras doses. Crianças providas com APDT-elevada com seu teor de FHA de quatro vezes tiveram títulos de FHA significativamente mais elevados do que crianças imunizadas com APDT-baixa ($p=0,0001$). Após imunização, títulos de anticorpo mais elevados induzidos por APDT-elevado do que

APDT-baixo ($p=0,0001$). Em contraste, títulos anti-PT de pré-imunização medidos por neutralização de CHO ou EIA foram similares nos dois grupos. Paradoxalmente, apesar de duas vezes o teor antigênico, títulos anti-PT eram mais baixos apesar da imunização com APDT-elevado do que APDT-baixo ($p=0,038$). Similarmente, anticorpos anti-FIM e pós-imunização de aglutinina foram mais elevados no grupo APDT-baixo ($p=0,01$ e $p=0,04$, respectivamente) apesar de quantidades idênticas de antígeno fimbrial nas duas formulações de vacina.

Antes da imunização, houve poucas diferenças em anticorpos anti-coqueluche dentre o grupo randomizado para receber o PRPT combinado com APDT como uma injeção única ou dado como injeções separadas nos mesmos dias ou em dias separados (Tabela 10). Os dados são apresentados separadamente para receptores de APDT-elevado ou APDT-baixo; contudo, devido ao pequeno número de crianças no grupo APDT-baixo, estes resultados não serão discutidos adicionalmente. O grupo randomizado para receber injeções separadas no mesmo dia teve anticorpos anti-PT mais elevados por neutralização CHO do que o grupo que estava para receber as injeções tow em dias separados (6,14 vs 4,80 unidades; $p<0,05$). Níveis de anticorpo pós-imunização também foram mais elevados neste grupo (176 unidades) do que o grupo de injeção separada em dias separados (122 unidades; $p<0,01$) embora níveis similarmente mais elevados fossem encontrados no grupo que recebeu a imunização única combinada (171 unidades; $p<0,01$). A resposta de anticorpo

anti-69K foi detectada neste grupo pós-imunização, embora as crianças imunizadas com duas injeções no mesmo dia tiveram uma resposta de anticorpo mais elevada do que as crianças imunizadas com a vacina única combinada e crianças imunizadas com duas injeções no mesmo dia tiveram resposta de anticorpo mais elevada do que crianças imunizadas em dias separados (243 vs 190 unidades; $p < 0,001$) do que crianças imunizadas com duas injeções em dias separados.

Os níveis de anticorpo anti-PRP eram similares entre os três grupos antes da imunização. Títulos de pós-imunização eram mais elevados em crianças imunizadas com injeções separadas no mesmo dia (66,0 ug/ml) do que em crianças imunizadas em dias separados (28,4 ug/ml; $p < 0,001$) ou em crianças que receberam a imunização combinada única (47,1; $p < 0,05$). A imunização combinada também causa níveis de anticorpo significativamente mais elevados do que as vacinas dadas em dias separados ($p < 0,05$). Nenhuma diferença foi detectada entre os grupos na percentagem que obteve níveis de "proteção"; todos os participantes tiveram títulos pós-imunização em excesso de 0,15 ug/ml e apenas 4 participantes (0-, 7%) falharam em obter um título em excesso de 1 ug/ml (3 no grupo que recebeu injeções separadas em dias separados e um no grupo que recebeu a injeção combinada única). Mais de 82% das crianças em cada grupo excedem um nível de anticorpo anti-PRP de 10 ug/ml.

Uma resposta de anticorpo vigorosa também foi causada contra os toxóides de tétano e difteria. Comparado com o grupo que recebeu a imunização em dias separados (2,1

ris


IU/ml) níveis de anticorpo anti-difteria significativamente mais elevados foram causados em crianças imunizadas com duas injeções no mesmo dia (3,1; $p < 0,01$ IU/ml) ou as injeções únicas combinadas (3,3 IU/ml; $p < 0,001$).

5 Anticorpos anti-tétano foram mais elevados em receptores das duas injeções no mesmo dia (6,7 IU/ml) do que em crianças imunizadas em dias separados (5,2 IU/ml; $p < 0,01$) ou crianças que receberam a injeção única combinada (4,8 IU/ml; $p < 0,001$). Todas as crianças tiveram títulos de
10 anticorpo anti-difteria e anti-tétano pós-imunização em excesso de 0,1 IU/ml, um nível de dez vezes o suposto nível de proteção. Mais de 96% de títulos anti-tétano e mais de 74% de títulos anti-difteria excederam um nível de 1,0 IU/ml; não houve diferença entre os grupos de imunização.

15 Exemplo 8:

Este Exemplo descreve a formulação e imunogenicidade de uma vacina de combinação multivalente contendo vacina de pólio inativada.

a) Preparação de poliovírus inativado

20 i) Cultivado em células MRC-5

Vírus de pólio inativado cultivado em células MRC 5 foi produzido como a seguir. As células foram de células de rim de um macaco verde (*Ceropithacus aethiops*):

25 A vacina de poliovírus trivalente, inativada continha componentes tipo I (Mahoney), tipo II (MEF) e tipo III (Saukett), que foram cultivados em células MRC-5 em contas microportadoras, processadas e inativadas separadamente antes da combinação em uma vacina de vírus de pólio

trivalente.

Uma suspensão de célula MRC-5 foi adicionada ao meio de crescimento de célula em um fermentador a pH 7,2 (6,9 a 7,6) e temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O meio de crescimento de

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

5 célula teve a seguinte composição:

Meio CMRL 1969

bicarbonato de sódio 0,15%

soro bovino adulto 5,00% - 7,00%

sulfato de neomicina (ug de atividade) 10 IU/ml

10 polimixina B 200 IU/ml

O meio CMRL tinha a seguinte composição:

Pó seco

Ingredientes mg/litro

aminoácido

15	L-alanina	25,0
	L-arginina (base livre)	58,0
	L-ácido aspártico	30,0
	L-cisteína .HCl	0,1
	L-cistina dissódio	24,0
20	L-ácido glutâmico .H ₂ O	67,0
	L-glutamina	200,0
	L-glicina	50,0
	L-histidina (base livre)	16,2
	L-hidroxiprolina	10,0
25	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-triptofano	10,0
5	L-tirosina	40,0
	L-valina	25,0
	Vitaminas	
	p-ácido aminobenzóico	0,05
	ácido ascórbico	0,05
10	d-biotina	1,00
	pantotenato de cálcio	1,00
	citrato de diidrogênio de colina	2,12
	ácido fólico	1,00
	glutaciona	0,05
15	i-inositol	2,00
	nicotinamida	1,00
	piridoxal .HCl	1,00
	Riboflavina-5-fosfato	0,10
	Tiamina HCl	1,00
20	Ingredientes	mg/litro
	Componente	
	cloreto de sódio	8000,0
	cloreto de potássio	400,0
	cloreto de cálcio(anidro)	140,0
25	sulfato de magnésio.7H ₂ O	200,0
	fosfato de sódio,dibásico anidro	180,0
	fosfato de sódio,não básico	70,0
	D-glicose (anidro)	1000,0

vermelho fenol

20,0

10,852 g fornece 1 litro de Meio CMRL 1969.

O meio foi preparado como a seguir:

450 litros de água isenta de pirogênio destilada são
5 adicionados a 905 ml de 1N ácido clorídrico. A esta mistura
é adicionado 5426,5 g de pó seco CMRL 1969 com agitação
contínua até dissolver em solução transparente. Os
seguintes produtos químicos foram adicionados na ordem
dada, com agitação contínua, esperando que cada produto
10 químico dissolva antes de adicionar o seguinte:

neomicina	mcg/mL
polimixina B	200 unidades/mL
solução de tampão TES	5000,0 mL
bicarbonato de sódio	750,0 g
15 soro bovino	30,0 L

O volume foi trazido até 500 L com água destilada
fresca e agitada até ser misturada uniformemente.

O crescimento de célula foi monitorado e quando as
células foram determinadas como estando em fase
20 logarítmica, o meio de crescimento usado foi descartado e
substituído por meio de crescimento de vírus. O meio de
crescimento de vírus tinha a seguinte composição:

Produtos químicos de Meio 199 com sais de Earle

bicarbonato de sódio	,26%
25 Tween 80	20 ppm
sulfato de neomicina (ug de atividade)	10 IU/mL
Polimixina B	200 IU/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
5	L-serina	12,5 mg/L
	L-treonina	15 mg/L
	L-cistina	10 mg/L
	citrato diH de colina	107 mg/L

O meio CMRL 199 tinha a seguinte composição:

10

Pó seco

Ingredientes	mg/litro
--------------	----------

L-alanina	25,0
-----------	------

L-arginina (base livre)	58,0
-------------------------	------

L-ácido aspártico	30,0
-------------------	------

15

L-cisteína.HCl.H ₂ O	0,1
---------------------------------	-----

L-cisteína dissódio	24,0
---------------------	------

L-ácido glutâmico H ₂ O	67,0
------------------------------------	------

L-glutamina	100,0
-------------	-------

glicina	50,0
---------	------

20

L-histidina (base livre)	16,2
--------------------------	------

L-hidroxiprolina	10,0
------------------	------

L-isoleucina	20,0
--------------	------

L-leucina	60,0
-----------	------

L-lisina	70,0
----------	------

25

L-metionina	15,0
-------------	------

L-fenilalanina	25,0
----------------	------

L-prolina	40,0
-----------	------

L-serina	25,0
----------	------

120

	L-treonina	30,0
	L-triptofano	10,0
	L-tirosina	40,0
	L-valina	25,0
5	p-ácido aminobenzóico	0,050
	ácido ascórbico	0,050
	d-biotina	0,010
	pantotenato de cálcio	0,010
	citrato diidrogênio de colina	1,060
10	ácido fólico	0,010
	glutathione	0,050
	i-inositol	0,050
	menadione	0,010
	nicotinamida (niacinamida)	0,025
15	ácido nicotínico (niacina)	0,025
	piridoxal .HCl	0,025
	piridoxina.HCl	0,015
	riboflavina-5-fosfato	0,010
	tiamina HCl	0,020
20	vitamina A acetato	0,100
	vitamina D (calciferol)	0,100
	vitamina E (fosfato de tocoferol)	0,010
	sulfato de adenina	,000
	trifosfato de adenosina	1,000
25	adeosina-5-ácido fosfórico	0,200
	deoxi-2-ribose	0,500
	d-ribose	0,500
	colesterol	0,200

12/10

guanina

0,300

hipoxantina

0,300

As culturas foram infectadas com o vírus de semente apropriado, em uma multiplicidade de infecção. A infecção prosseguiu a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Quando o C.P.E. de vírus estava completo, a cultura foi resfriada a 2°C até 15°C .

A colheita do vírus foi clarificada por filtração. O volume de colheita de vírus foi reduzido por ultrafiltração de membrana, com um corte de peso molecular nominal de 100.000 até um volume adequado para diafiltração contra 0,04M de tampão de fosfato. Após diafiltração, o volume foi adicionalmente concentrado até um volume adequado para filtração de gel. O concentrado de vírus vivo foi amostrado e armazenado a 2°C até 8°C .

O concentrado de vírus vivo foi aplicado a uma coluna de filtração de gel e eluído da coluna com 0,04M de tampão de fosfato. A fração de vírus foi coletada pela monitoração da densidade óptica do eluato de coluna a 254 e 280 nm.

Uma segunda etapa de purificação foi realizada utilizando um meio de permuta de íon-DEAE, com 0,04M de fosfato como o tampão de eluição. Esta etapa pode ser repetida duas vezes, se a quantidade de meio de permuta de íon utilizada era insuficiente, como determinado pela monitoração a 254 e 280 nm.

A fração de vírus coletada foi concentrada e dialisada contra Meio Especial de Hank para reduzir o teor de fosfato. O meio Especial de Hank tem a seguinte composição:

122

	Aminoácidos	mg/litro
	D, L-alanina	25,00
	L-arginina .HCl	58,00
	D, L-ácido aspártico	30,00
5	L-cisteína HCl H ₂ O	0,10
	L-cisteína 2HCl	26,00
	D,L-ácido glutâmico	67,00
	L-glutamina	100,00
	glicina	50,00
10	L-histidina HCl .H ₂ O	16,20
	L-hidroxiprolina	10,00
	D,L-isoleucina	20,00
	D,L-leucina	60,00
	L-lisina .HCl	70,00
15	D,L-metionina	15,00
	D,L-fenilalanina	25,00
	L-prolina	40,00
	D,L-serina	25,00
	D,L-treonina	30,00
20	D,L-triptofano	10,00
	L-tirosina (sal de dissódio)	40,00
	D,L-valina	25,00
	Vitaminas	
	ácido ascórbico	0,050
25	d-biotina	0,010
	vitamina D (calciferol)	0,100
	D-pantotenato de cálcio	0,010
	cloreto de colina	1,060

123/

	ácido fólico	0,010
	i-inositol	0,050
	Sais minerais	mg/litro
	cloreto de cálcio (anidro)	40,00
5	nitrato férrico .9H ₂ O	0,10
	cloreto de potássio	400,00
	cloreto de sódio	8000,00
	sulfato de magnésio.7H ₂ O	200,00
	Outros ingredientes	
10	sulfato de adenina	10,000
	trifosfato de adenosina(sal de dissódio)	1,000
	ácido adenílico	0,200
	d a tocoferol ácido fosfórico(sal de sódio)	0,010
	colesterol	0,200
15	desoxirribose	1000,000
	glutathione	0,050
	guanina .HCl	0,300
	hipoxantina (sal de sódio)	0,300
	ribose	0,500
20	acetato de sódio.3H ₂ O	81,500
	timina	0,300
	Tween 80	20,000
	Uracila	0,300
	Xantina (sal de sódio)	0,300
25	Menadiona	0,010
	ácido nicotínico	0,025
	nicotinamida	0,025
	p-ácido aminobenzóico	0,050

127

	Piridoxal .HCl	0,025
	Piridoxina .HCl	0,025
	Riboflavina-5-fosfato	0,010
	tiamina .HCl	0,010
5	vitamina A (acetato)	0,140

A fração de vírus purificada foi filtrada, através de um filtro de porosidade de 0,2 u.

Uma ou mais frações de concentrado de vírus purificadas podem ser agrupadas para inativação. Com base nos resultados do teste ELISA, o grupo de vírus monovalente foi diluído para:

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 grupo monovalente foi aquecido até $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a seguir filtrado através de um filtro de porosidade de 0,2 u.

A quantidade necessária de formalina, para obter uma concentração de 1:4000, foi adicionada. O grupo de vírus e formalina foram misturados e agitados continuamente a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O grupo de vírus monovalente foi amostrado para viabilidade. No sexto dia, o grupo de vírus de inativação foi filtrado através de um filtro de 0,2 u e mantido a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. No décimo terceiro dia de inativação, o grupo de vírus foi filtrado através de um filtro de 0,2 u.

Um ou mais componentes monovalentes inativados foram selecionados e assepticamente conectados a um tanque de agrupamento. O grupo monovalente foi adicionalmente

125
11

concentrado, por ultrafiltração de membrana, com um corte de peso molecular nominal de 100.000. Diálise, contra diluente RIV-PBS:

	fosfato de hidrogênio	
5	de dissódio (Na_2HPO_4)	0,346 g/CCml
	fosfato de dihidrogênio	
	de potássio (KH_2PO_4)	187 g/CCml

com Tween foi então realizado para obter uniformidade do produto final.

10 Albumina (humana) foi adicionada para obter uma concentração final de 0,5%. O concentrado monovalente agrupado foi então filtrado através de um filtro de 0,2 u. Diluente RIV-PBS com Tween foi adicionado para obter uma
15 concentração estimada (por cálculo) de 10 a 15 doses por 0,5 ml. O concentrado agrupado foi armazenado a 2°C até 8°C até necessário.

Os volumes apropriados dos componentes monovalentes tipos I, II e III foram calculados e combinados. A vacina trivalente foi direcionada para conter:

- 20 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 a 2°C até 8°C até utilizado. Formaldeído e 2-fenoxietanol foram
25 adicionados e misturados. Albumina (humana) foi adicionada, por cálculo, para fornecer uma concentração final de 0,5%.

(ii) Cultivado em células Vero

Ampolas do grupo de célula de trabalho Vero foram sub-

126

cultivadas até o nível de passagem celular escolhida. As
ampolas de célula foram preservadas em nitrogênio líquido.
As células foram cultivadas utilizando contas de micro-
suporte que eram contas esféricas de um diâmetro médio de
5 aproximadamente 100 micrômetros, constituídas por polímeros
Dextrano tendo radículas de DEAE enxertado em sua
superfície (dietilaminoetila), dando as mesmas uma carga
positiva.

O meio básico para crescimento celular era o "Meio
10 essencial mínimo" (MEM) de Eagle em solução salina Earle
enriquecido com 0,2% de hidrosilado de lactalbumina, 0,1%
de dextrose, 5% de soro de vitelo. Cada ml de meio contém
os seguintes antibióticos:

Estreptomicina:	75 unidades por mL
15 Neomicina:	14 unidades por mL
sulfato de Polimixina B	35 unidades por mL

As células Vero foram progressivamente subcultivadas
em Biogeradores de tamanho crescente. A seguir, o meio de
cultura e o volume suficiente de contas de microsuporte por
litro de meio foram introduzidos no biogerador industrial.
20 A temperatura foi estabilizada a + 37°C. As células
coletadas por tripsinação foram adicionadas e colocadas sob
agitação. A cultura continuou durante 4 a 7 dias a + 37°C,
a agitação sendo progressivamente aumentada. Normalmente,
25 ao término da cultura, um aumento de 6 a 20 vezes no
crescimento celular foi observado. O meio utilizado para o
crescimento de vírus foi o meio 199 (Parker) em solução
salina Earle, enriquecida com 0,1% de dextrose. Este meio

123

contém os mesmos antibióticos, na mesma concentração que o meio para crescimento celular, porém não contém soro de vitelo. No 4º/7º dia de crescimento celular, a agitação do biogerador no estágio industrial, foi parada; as contas assentaram no fundo do tanque, o meio antigo é removido. Um pouco de meio 199 isento de soro foi então introduzido em cada biogerador e agitado. Este meio foi então extraído, efetuando uma lavagem das contas e células. Um pouco de meio 199 isento de soro foi transferido para o biogerador juntamente com o volume necessário de lote de semente. O vírus foi adsorvido nas células por agitação suave. Ao término da cultura de vírus, a agitação foi parada. A suspensão de vírus foi extraída e coletada e as contas foram retidas por filtração. A suspensão de vírus foi homogeneizada. A colheita, filtrada em uma membrana orgânica de poros de tamanho médio a 0,20 mm foi armazenada a +4°C. O vírus foi concentrado por ultrafiltração.

O vírus foi adicionalmente purificado por cromatografia de permuta de íon utilizando suporte de DEAE-dextrano-Spherosil, equilibrado com tampão de fosfato 0,04 M, pH = 7,00. O vírus foi adicionalmente purificado por cromatografia de filtração de gel, utilizando uma coluna contendo um gel agarose, Sepharosis CL-6B tamponado com fosfato 0,04 M, pH = 7,00. O vírus foi adicionalmente purificado por cromatografia utilizando DEAE dextrano-Spherosil, tamponado com um tampão de fosfato 0,04 M, pH = 7,00. Tão logo a última purificação seja realizada, a suspensão de vírus foi ajustada até o volume necessário com

128

algum meio M-199, pH = 7,0 sem fosfato, concentrado dez vezes em EDTA 5 mm, glicina a 0,5 % e Tween 80 em uma concentração final de 50 mg/litro (Meio de inativação). Esta mistura constitui uma "Mistura de vírus concentrado" e é filtrada em uma membrana de 0,2 um. A suspensão de vírus concentrado foi armazenada a +4°C pendendo inativação.

Um ou vários lotes de "Mistura de vírus concentrada" do mesmo tipo foram misturados e possivelmente diluídos ou ajustados com algum "Meio de inativação" em um tanque adequado. A diluição foi ajustada para o volume correto de acordo com os tipos para se obter um título de antígeno D entre:

- 1500 e 2000 D unidades no tipo 1
- 800 e 1000 D unidades no tipo 2
- 1000 e 1500 D unidades no tipo 3

e uma taxa de proteína de:

- ≤ 40 ug/ml no tipo 1
- ≤ 70 ug/ml no tipo 2
- ≤ 30 ug/ml no tipo 3

A suspensão de vírus concentrado purificada, ajustada foi filtrada em uma membrana de 0,2 um no máximo 72 horas antes do início de ativação. A suspensão de vírus foi então aquecida novamente a +37°C. Para inativação, a solução de formaldeído foi adicionada para se obter uma concentração a 1/4000. Para seguir a cinética de inativação após 24, 48, 72 e 96 horas, as amostras foram retiradas durante os quatro primeiros dias. Uma amostragem de 10 ml foi realizada com neutralização imediata do formaldeído por

ação de bissulfeto de sódio e armazenagem direta a -20°C pendendo titulação.

No 6º dia, a suspensão de vírus durante inativação foi filtrada utilizando um filtro de 0,22 μm . Após filtração, a incubação do líquido continua a $+37^{\circ}\text{C}$ por mais 6 dias com uma agitação constante. No 9º dia de inativação, 3 vezes o volume correspondendo a 3000 doses humanas e 500 ml mínimo da colheita individual bruta foi retirada. Este volume foi calculado de acordo com o título em antígeno D da "Mistura de vírus concentrada". A amostragem foi diretamente neutralizada com algum bi-sulfeto de sódio para parar a ação do formaldeído residual. A suspensão de vírus inativado e homogeneizado foi então retirada do incubado a $+37^{\circ}\text{C}$ após a inativação do 12º dia. O volume foi diretamente neutralizado com algum bissulfeto de sódio e armazenado a $+4^{\circ}\text{C}$.

Para preparar um lote trivalente concentrado de IPV preparações monovalentes foram combinadas para fornecer:

tipo 1 (Mahoney)	400 unidades de antígeno D
tipo 2 (MEF-1)	80 unidades de antígeno D
tipo 3 (Saukett)	20 unidades de antígeno D
Meio 199 - pH 7,2 q.s. a 1 ml	

A mistura foi agitada para homogeneizar filtrado em uma membrana de porosidade 0,22 micron.

O produto de volume final foi obtido dos lotes de volume trivalentes concentrados, como aqueles descritos, por diluição com meio 199, pH 7,2, sem vermelho fenol de modo que a dose unitária contém por 0,5 ml.

138

40 unidades de antígeno D para o tipo 1

8 unidades do antígeno D para o tipo 2

32 unidades do antígeno D para o tipo 3

(b) Formulações

5 Uma formulação de vacina multivalente (APDT) continha cinco antígenos de coqueluche (10 ug PT, 5 ug FHA, 5 ug FIM 2 e 3, 3 ug 69K), 15 Lf de toxóide de difteria, 5 Lf de toxóide de tétano, 1,5 mg de fosfato de alumínio como adjuvante e 0,6 % de 2-fenoxietanol como conservador por
10 0,5 ml (Clássico). A vacina foi utilizada individualmente ou em combinação com ^{prolax} IPV produzido em células MRC-5 (mIPV) preparadas como descrito acima, IPV produzido em células Vero (vIPV) preparadas como descrito acima, ou com OPV (Connaught Laboratories Limited). Para não romper seu
15 programa de imunização de rotina, vacina conjugada de toxóide de tétano-Haemophilus influenzae b foi administrada no momento da visita de acompanhamento.

População

20 Crianças de 17 a 19 meses de idade saudáveis que tinham sido imunizadas com três doses de DTP e 2 doses de OPV, ou 3 doses de DTP-IPV antes de 8 meses de idade foram recrutadas no estudo. Após consentimento informado por escrito de pais ou guardiães, as crianças foram alocadas por uma lista de bloco equilibrado gerada por computador de
25 números aleatórios para receber um de cinco regimes de vacina (Tabela 10?) Vacinas de combinação contendo A3DT foram dadas por via intramuscular com uma agulha de 25 mm no músculo deltóide do braço ou no músculo vasto lateral da

coxa se o deltóide fosse de massa insuficiente. IPV (0,5 ml; mIPV ou v1PV) quando dados individualmente eram administrados pela via subcutânea utilizando uma agulha de 12,5 a 16 mm em comprimento, vacinas contendo APDT foram dadas no membro esquerdo; o membro direito foi utilizado para as vacinas de poliovírus inativadas quando dadas separadamente e para todas as vacinas conjugadas *Haemophilus influenzae b* na segunda visita.

Monitoração laboratorial e clínica

Amostras de sangue foram coletadas por venopuntura ou por picada do dedo antes de e 28 dias após a imunização. Anticorpos IgG a PT foram medidos por imunoensaio de enzima e anticorpo de neutralização de PT por neutralização CHO. Anticorpos IgG anti-FHA, anti-FIM, e anti-69K foram medidos por imunoensaio de enzima; as unidades foram calculadas utilizando a antisoro de referência de FDA US (#3). Aglutininas de coqueluche também foram medidos. Antitoxina de difteria foi medida por ensaio de microneutralização e antitoxina de tétano por imunoensaio. Anticorpos de anticorpo-poliovírus tipo 1, 2 e 3 foram medidos por neutralização viral. Títulos de anticorpo foram expressos como títulos de média geométrica; amostras de soro com títulos menores do que o limite de detecção de teste foram atribuídos um valor de metade do limite de detecção inferior para fins de título de cálculos estatísticos.

Títulos de anticorpo de média geométrica e 95% de intervalos de confiança foram computados para o título de anticorpo para cada antígeno de vacina pré- e pós-

10

15

25

133

Após imunização, houve um aumento de anticorpo significativo em todos os grupos de vacina contra todos os antígenos incluídos nas vacinas. Houve poucas diferenças na resposta de anticorpo aos antígenos de coqueluche dependendo do grupo de vacina de pólio. Não houve diferença em anticorpo anti-PT por imunoensaio de enzima ou neutralização de CHO ou em anticorpos anti-FHA. Anticorpos anti-69K foram significativamente mais elevados no grupo que recebeu a vacina mIPV combinada com APDT (77,7 unidades) do que o grupo que recebeu mIPV como uma injeção separada (37,9 unidades; $p < 0,001$) ou o grupo que recebeu OPV (47,7; $p < 0,05$). Anticorpos anti-FIM e aglutininas também eram mais elevadas no grupo que recebeu o grupo APDT-mIPV combinado do que o grupo que recebeu injeções separadas; contudo, estas mesmas diferenças também foram detectadas nos soros pré-imunização.

As diferenças foram detectadas nas respostas de anticorpo anti-poliovírus. Tanto APDT-mIPV como APDT-vIPV causaram anticorpos anti-poliovírus tipo 1 e tipo 3 mais elevados ($P < 0,001$ para todas as comparações). Níveis de anticorpo anti-poliovírus tipo 2 também foram mais elevados após APDT-mIPV (10.633 diluição recíproca) e APDT-vIPV (10.256) do que OPV (7185); contudo, isto apenas atingiu importância estatística para APDT-mIPV ($p < 0,05$). Os títulos de anticorpo anti-poliovírus obtidos com APDT-MIPV combinado também foram mais elevados do que quando o mIPV foi dado como uma injeção separada (6620-1 $p < 0,05$).

Títulos de anticorpo anti-tétano eram mais elevados em

134

receptores de OPV do que qualquer uma das combinações IPV ($p < 0,05$). Títulos anti-difteria também eram mais elevados em receptores OPV porém este apenas atingiu importância estatística comparado com o grupo APDT-vIPV ($p < 0,05$).

5 Após imunização, todas as crianças tiveram níveis de anticorpo contra difteria e tétano em excesso de 0,01 IU/ml e todas exceto uma criança tiveram níveis em excesso de 0,1 IU/ml.

10 Os resultados deste estudo demonstram que uma vacina de coqueluche de componente contendo PT, FHA, 69K, e FIM combinado com toxóides de difteria e tétano também podem ser combinados com vacina de poliovírus inativada sem qualquer aumento significativo em reatogenicidade ou perda de imunogenicidade. Em contraste com os resultados com o

15 DTP de célula integral, não houve diminuição da resposta de anticorpo aos antígenos de *Bordetella pertussis*. Não houve diferenças substanciais entre as vacinas IPV preparadas em linhagens de célula MRC-5 ou Vero; as duas vacinas induziram níveis de anticorpo anti-poliovírus de soro mais

20 elevados do que OPV. A demonstração da equivalência de mIPV e vIPV facilita a implementação da vacina de coqueluche acelular em jurisdições com preferência para um IPV derivado de uma linhagem de célula específica.

25 Em conclusão da experimentação reportada neste Exemplo, isto demonstra que uma vacina de coqueluche acelular de cinco componentes pode ser seguramente combinada com qualquer uma das duas vacinas IPV para a quarta dose de vacina entre 17 e 19 meses de idade.

135/

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120

SUMÁRIO Da INVENÇÃO

Em sumário desta revelação, a presente invenção fornece novas preparações de antígenos de Bordetella e não Bordetella para produzir vacinas de coqueluche de multi-
5 componente. Tais vacinas são seguras, não reatogênico, imunogênicas e de proteção em seres humanos. Modificações são possíveis no âmbito da presente invenção.

26

Tabela 1. Vacinas de coqueluche acelulares

vacina	PT	agente de formação de toxóide	FHA	P.69	AGG2	AGG3	Referência
AMVC	+	H ₂ O ₂ ^a	-	-	-	-	63
Massa PHL ^b	+	TMN ^c	-	-	-	-	63
Institut Mérieux	+	Gl ^d	+	-	-	-	64
Smith-Kline	+	F1 ^e /Gl	+	-	-	-	32
	+	F1/Gl	+	+	-	-	32
CAMR ^f	+	F1	+	-	+	+	65
Lederle/Takeda	+	F1	+	+	+	-	66
Connaught	+	Gl	+	-	+	+	32
	+	Gl	+	+	+	+	67

^aperóxido de hidrogênio inativado. ^b Massachusetts Public Health Laboratories. ^c TMN, tetranitrometano-inativado. ^dGl, glutaraldeído-inativado. ^eF1, formalina-inativada,

^fCentre for Applied Microbiology and Research.

127

Tabela 2 - Respostas de anticorpo IgG a antígeno de coqueluche e toxóides de difteria e tétano em adultos e crianças pequenas após imunização com placebo ou coqueluche acelular (AP), difteria-tétano-coqueluche (DTP) ou toxóides DTP (ADTP) acelulares de multicomponentes.

	ADULTOS				CRIANÇAS			
	antes de imunização		pós-imunização dia 28		antes de imunização		após imunização	
	placebo	AP CP 10/5/5/3	Placebo	AP CP 10/5/5/3	DTP	ADTP CP 10/10/5/3 DT	DTP	ADTP CP 10/10/5/3 DT
toxóide de coqueluche	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 filamentososa	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)
aglutinógenos	21,26 (12,14-37,23)	28,64 (12,20-67,21)	27,0 (15,37-47,78)	2048,00 (102,62 - 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	11,47 (6,41-	7,46 (3,51-	855,13	6,54 (2,79-	9,45 (5,50-	60,13 (24,59-	116,16 (57,87-

138

	(4,00-15,56)	20,55	15,87	(396,41-1844,67)	15,33	16,23	147,04	233,19
ensaio de neutralização de célula 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)
não estudado	16	15	16	15	10	25	12	

139

TABELA 3. Resultados sorológicos de vacinas de coqueluche de componentes em bebês (2, 4 e 6 meses de idade)

Títulos médios geométricos											
Experim. clínico	produto	estudo	número de participantes	PT	FHA	69 kDa	aglutinógenos fimbriais	neutralização de célula CHO	aglutinação	Tét.	Dif
1	CP ₁₀₅₅₃ DT	U.S. NIAID	108	38	37	3	229	160	85	7,8	0,8
	CP ₁₀₅₅₃ DT	Multicentro	113	36	36	113	241	150	73	5,0	0,4
	célula	Estudo	95	20	51	101	70	80	42	-	-
	integral	comparati-vo		67	3	64	193	270	84	-	-
	(Mass.) célula integral	(ciclo I)	312								
	integral (Ledette)										
2	CP ₁₀₅₅₃ DT	fase II	315	87,1	50,2	29,9	239,8	29,6	-	1,5	0,3
	célula integral (CLL)	Canadá	101	20	4,7	6,4	603,2	2,6	-	1,2	0,4
3	CP ₁₀₅₅₃ DT	fase IIB	32	58,4	45,2	40,6	111,4	32,7	-	1,0	0,14

	CP ₂₀₀₅₃ DT célula integral (CLL)	Canadá	33 30	133,3 10,4	95,0 8,9	37,1 6,8	203,8 393,9	82,4 4,0	1,1 1,8	0,21 0,31
4	CP ₁₀₅₅₃ DT CP ₂₀₀₅₃ DT	fase IIC Canadá	42 250	105,1 101,6	82,5 163,9	71,1 87,6	358,6 220,6	66,9 68,7	2,0 1,8	0,33 0,38
5	CP ₂₀₀₅₃ DT célula integral (CLL)	Montreal Estudo de exequibilidade	58 58	212,7 101,4	83,4 11,7	106,3 16,8	601,9 906,9	109,6 6,0	1,9 1,1	0,53 0,27
6	CP ₁₀₅₅₃ DT CP ₂₀₀₅₃ DT célula integral (CLL) célula integral (Ledete)	U.S. NIAD Estudo comparati-vo (ciclo II)	80 80 80	42 39 2	34 87 3	50 43 9	310 184 33	196 254 54	185 137 167	86

14/

CLL - Connaught Laboratories Incorporated, Swiftwater, Pennsylvania
CLL - Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario
Mass - Massachusetts Public Laboratories
Lederle - Lederle Laboratories Inc.

163

Tabela 4 - Eficácia de Vacinas de Coqueluche Acelulares

Vacina	Eficácia	
	A	B
CP _{10/5/5/3} DT	84,7 80,3->88,5) ¹	77
5 PT ₂₅ .FHA ₂₅ DT	58 (49,8->64,8) ¹	
DPT ²	47,9 (31,7->56,9) ¹	

A: definição do caso: 21 dias de tosse espasmódica e cultura positiva

10 B: definição do caso: tosse de coqueluche branda de pelo menos um dia

Observação 1: limites de confiança

Observação 2: vacina de coqueluche de célula integral

143

TABELA 5

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

124

TABELA 6

VACINA	N	Pólio 1	Pólio 2	Pólio 3
HCPDT-VIPV-PRP-T (líquido)	328	6,24 (533-732)	2.397 (2.043- 2.814)	1.268 (1.082 - 1.485)
HCPDT-MIPV para reconstituir PRP-T	323	718 (589-875)	2.173 (1.837- 2.570)	1.938 (1.640- 2.291)
HCPDT-MIPV e PRP-T (separado)	108	702 (513-960)	2.595 (2.005 - 3.360)	1.837 (1.362 - 2.477)
DPT-MIPV para reconstituir PRP-T	105	889 (630-1.255)	2.597 (2.000 - 3.373)	2.726 (2.108 - 3.525)

145

TABELA 7

ANTÍGENO	HCPDT-vIPV-PRP-T (líquido) (n=324)	HCPDT-mIPV para reconstituir PRP- T (n=322)	HCPDT-mIPV e PRP- T (separado) (n=108)	DPT-mIPV para reconstituir PRP- T (n=105)
FT	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)

146

TABELA 8

ANTÍGENO	HCPDT-VIPV 1 injeção (n = 85)	HCPDT+VIPV 2 injeções (n = 84)	HCPDT-mIPV 1 injeção (n = 87)	HCPDT+mIPV 2 injeções (n = 81)	HCPDT+OPV HÍBRIDO+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
Pólio tipo 1	6672	5681	10242	8784	2110
Pólio tipo 2	10256	7861	10633	6620	7185
Pólio tipo 3	5771	7781	6798	8541	5563

147

TABELA 9 - Combinação de PRP-T com Vacina de Coqueluche de componente quando dada combinada ou separada no mesmo dia ou em dias separados

CP _{10/5/5/3} DT (Clássico) e CP _{20/20/5/3} DT (Híbrido) com 19 meses (1 mês após)			
ANTÍGENO	Clássico/Híbrido para reconstituir PRP-T Injeção única (n = 181)	Clássico/híbrido & PRP-T injeção separada mesmo dia (n = 181)	Clássico/híbrido & PRP-T injeção separada 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
FLM	430	434	315
Agglutininas	1004	1033	682

Observação: valores com letras correspondentes diferiram significativamente ($p \leq 0,05$)

Referências:

1. Muller, A.S. Leeuwenburg, J. and Pratt, D.S. (1986)
Pertussis: epidemiology and control. *Bull WHO* 64: 321-331.
2. Fine, P.E.M. and Clarkson, J.A. (1984).
5 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,
10 D.G. Meissner, M., Zastrow, J.A., Berg, J.L., Drinka, P.,
and Phillips, R. (1991). A pertussis outbreak in a
Wisconsin nursing home. *J. Infect. Dis.* 164: 704-710.
5. Halperin, S.A. and Marrie, T.J. (1991a). Pertussis
encephalopathy in an adult: case report and review. *Rev.*
15 *infect. Dis.* 13: 1043-1047.
6. Onorato, I.M., Wassilak, S.G. and 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,
20 M.H., and 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., and Ishii, S. (1982). Subunit
25 structure of islet-activating protein. pertussis toxin, in
conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21: 5516-5522.
9. Tuomanen, E. and 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., and Yocum D.E. (1992). Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* 60: 4578-4585

5 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. and Granstrom G. (1993). Serological correlates in whooping cough. *Vaccine* 11:445-448.

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

14. Thomas, M.G., Redhead, K., and Lambert, H.P.
15 (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., and Lambert, H.P. (1989b). Serum IgG, IgA, and IgM responses to
20 pertussis toxin, filamentous haemagglutinin, 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., and Kurashige, T. (1991).
25 Immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *J. Infect. Dis.* 163: 559-563.

17. Petersen, J.W., Ibsen. P.H., Haslov, K., Capiiau, C., and Heron, I. (1992a). Proliferative responses and gamma interferon and tumor necrosis factor production by
30 lymphocytes isolated from trachobroncheal 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.,
5 Anderson, E.L., Meade, B.D., Deloria, M.A., and the NIAID
Acellular Pertussis Vaccine Group. (1992b). Effect of
transplacental antibody and development of pertussis toxin
(PT) and filamentous haemagglutinin (FHA) antibody after
acellular (AC) and whole cell (WC) pertussis vaccines in
10 infants. *Pediat. Res.* 31:91A.

19. Oda, M., Cowell, J.L., Burstyn, D.G., Thaib, S.,
and Manclark, C.R. (1985). Antibodies to *Bordetella*
pertussis in human colostrum and their protective activity
against aerosol infection of mice. *Infect. Immun.*
15 47:441-445.

20. Petersen, J.W., Bentzon, M.W., Capiou, C.,
and 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:
20 279-288.

21. Oda, M., Cowell, J.L., Burstyn, D.G., and
Manclark, C.R. (1984). Protective activities of the
filamentous haemagglutinin and the lymphocytosis-promoting
factor of *Bordetella pertussis* in mice. *J. Infect. Dis.*
25 150: 823-833.

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

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

24. Weiss, A.A. and 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., and Moss, J. (1985). ADP ribosylation of transducin by pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 260: 13478-13482.

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

28. Munoz, J.J., Arai, H., and 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., and Falkow, S. (1989). Filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2637-2641.

30. Di Tommaso, A., Domenighini, M., Bugnoli, M., Tagliabuc, A., Rappuoli, R., and De Magistris, M.T. (1991).

Identification of subregions of *Bordetella pertussis*

filamentous haemagglutinin that stimulate human T-cell responses. *Infect. Immun.* 59: 3313-3315.

31. Tomoda, T., Ogura, H., and Kurashige, T. (1992). The longevity of the immune response to filamentous
5 haemagglutinin 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.,
10 Englund, J.A., Pichichero, M.E., Deloria, M.A., Deforest, A., and the NIAID Acellular Pertussis Vaccine Study Group (1992). Comparison of thirteen cellular pertussis vaccines: serological response. *Pediatr. Res.* 31: 91A.

33. Kimura, A., Mountzoutos, K.T., Relman, D.A.,
15 Falkow, S., and Cowell, J.L. (1990a). Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin: 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., and Leef, M.F.
20 (1992). Mucosal immunization with filamentous haemagglutinin protects against Bordetella pertussis respiratory infection. *Infect. Immun.* 60: 1482-1488.

35. Montaraz, J.A., Novotny, P., and Ivanyi, J. (1985). Identification of a 68-kilodalton protective
25 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., and Brennan, M.J. (1991). Pertactin, and Arg Gly-Asp-containing
30 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. and 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., and 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., and 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. and 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., and Charles, I.G. (1991). Biological and protective properties of the 69kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*: a novel formulation for an cellular vaccine. *J. Infect. Dis.* 164: 114-122.

42. Shahin, R. D., Brennan, M.J., Li. Z.M., Meade, B.D., and 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., and 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., and Irons, L.I. (1985b). Protection against intranasal infection of mice with *Bordetella pertussis*. *Develop. Biol. Stand.* 61: 165-172

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

46. Sato, Y., Kimura, M., and 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 efficacy and adverse effects. *Lancet* i :955-960.

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

50. Storsaeter, J., Hallander, H., Farrington, C.P., Olin, P., Moliby, R., and 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., and 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., and Vose, J. (1991). A novel process for preparing an acellular pertussis vaccine composed of non-pyrogenic toxoids of pertussis toxin and filamentous haemagglutinin. *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., and 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., and 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., and Cohen, N. (1998). Safety and immunogenicity in adults of pertussis toxoid inactivated with tetranitromethane. 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., and 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., and 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., and 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. and 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 diphtheria-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* type b polysaccharide tetanus protein conjugate vaccine on responses to concurrently administered diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *JAMA* 1992; 267:673-8.

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

75. Gold R., Scheifele D., Barreto L. et al. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* vaccine (tetanus toxoid conjugate) administered concurrently or combined with diphtheria and tetanus toxoids, pertussis vaccine and inactivated poliomyelitis vaccine to healthy 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 diphtheria-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
5 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,
10 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. Scheifele D, Gold R, Law B, et al: Decline in
15 *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
20 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
25 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
30 Disease Report 22-3, F1-F3 Feb 1, 1996.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica multi-valente para proporcionar proteção em um hospedeiro contra doença causada por infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium*
5 *tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, poliovírus e *Haemophilus influenzae*, caracterizada por consistir essencialmente em:

(a) toxoide pertussis em uma quantidade de 5 a 30 µg de nitrogênio, hemaglutinina filamentosa em uma quantidade
10 de 5 a 30 µg de nitrogênio, pertactina em uma quantidade de 3 a 15 µg de nitrogênio e aglutinogênios fimbriais dos tipos 2 e 3 em uma quantidade de 1 a 10 µg de nitrogênio; em que o toxoide pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina e aglutinogênios fimbriais dos tipos 2 e 3 estão
15 presentes em forma purificada,

(b) toxoide tetânico em uma quantidade de 1 a 10 Lfs,

(c) toxoide diftérico em uma quantidade de 10 a 20 Lfs,

(d) poliovírus inativado na forma de uma mistura de
20 poliovírus inativado dos tipos 1, 2 e 3, na quantidade de 20 a 50 D unidades antigênicas de poliovírus do tipo 1, na quantidade de 5 a 10 D unidades antigênicas de poliovírus do tipo 2, na quantidade de 20 a 50 D unidades antigênicas de poliovírus do tipo 3, e

25 (e) um conjugado de uma molécula portadora contendo de 15 a 35 µg de toxoide tetânico e de 5 a 15 µg de poliribosil-ribitol fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* do tipo b,

sendo que as quantidades respectivas dos componentes

30 (a), (b), (c), (d) e (e) são determinadas na base de uma

dose única humana, a dita composição imunogênica sendo formulada como uma vacina para administração *in vivo* a um hospedeiro, em que os componentes individuais da dita composição são formulados de uma forma em que a
5 imunogenicidade dos ditos componentes individuais não é prejudicada pelos outros componentes individuais da dita composição, e

em que a composição ainda compreende um adjuvante que é fosfato de alumínio.

10 2. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que contém 20 µg de nitrogênio de toxoide pertussis, 20 µg de nitrogênio de hemaglutinina filamentosa, 5 µg de nitrogênio de aglutinogênios e 3 µg de nitrogênio de pertactina em uma
15 dose única humana.

3. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato do componente de toxoide tetânico (b) estar presente em uma quantidade de 5 Lfs e do componente de toxoide diftérico (c) estar presente
20 em uma quantidade de 15 Lfs.

4. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato do poliovírus compreender uma mistura de poliovírus inativado dos tipos 1, 2 e 3 nas proporções de 40 D unidades antigênicas de
25 poliovírus do tipo 1, 8 D unidades antigênicas de poliovírus do tipo 2, 32 D unidades antigênicas de poliovírus do tipo 3 em uma dose única humana.

5. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do conjugado (e)
30 ser proporcionado em uma forma liofilizada e ser

reconstituído para administração na dita composição imunogênica pelos componentes da composição.

6. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de que compreende, por 0,5 ml dose:

5 20 µg de toxoide pertussis,
 20 µg de hemaglutinina filamentosa,
 5 µg de aglutinogênios fimbriais dos tipos 2 e 3,
 3 µg de pertactina,
 15 Lf de toxoide diftérico,
10 5Lf de toxoide tetânico,
 40 D unidades antigênicas de poliovírus do tipo 1,
 8 D unidades antigênicas de poliovírus do tipo 2,
 1,5 mg de fosfato de alumínio, e

 um conjugado de uma molécula portadora contendo 20 µg
15 de toxoide tetânico e 10 µg de poliribosil-ribitol fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* do tipo b,

 em que o toxoide pertussis, hemaglutinina filamentosa, aglutinogênios fimbriais, pertactina, toxoide diftérico, toxoide tetânico e poliovírus são formulados de modo que a
20 imunogenicidade dos ditos componentes individuais não é prejudicada pelos outros componentes individuais da composição.

7. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de ainda compreender, por dose
25 de 0,5 ml, 0,6% de 2-fenoxietanol.

8. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato do conjugado ser proporcionado em forma liofilizada e ser reconstituído para administração na dita composição imunogênica pelos componentes da
30 composição.

FIGURA 1

PASTA DE CÉLULA DE BORDETELLA

