

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98.257

REQUERENTE: AMERICAN CYANAMID CIMPANY, norte-americana,
industrial, Wayne, New Jersey, Estados
Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VACINAS
EFICAZES CONTRA A BORDERELLA PERTUSSIS
COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE ANTÍGE-
NIOS DA POSSE CONVULSA PURIFICADOS INDIVI-
DUALMENTE"

INVENTORES: THOMAS G. ECKHARDT, JOHN W. GOTTO, DAVID
K. McCLINTOCK e JANE V. SCOTT

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

11 de Julho de 1990 No.07/549,236, nos Estados Unidos
da América do Norte

AMERICAN CYANAMID COMPANY

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VACINAS EFICAZES CONTRA A BORDE
TELLA PERTUSSIS COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE ANTIGÊNIOS DA
TOSSE CONVULSA PURIFICADOS INDIVIDUALMENTE"

MEMÓRIA DESCRITIVA

RESUMO

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de uma vacina para a prevenção de doenças provocadas por Bordetella pertussis, que consiste em se incorporar na referida vacina a hemaglutinina filamentosa de antigénios da tosse convulsa, factor de promoção de linfocitose desintoxicado e uma proteína de membrana exterior de 69 quilodalton, em que os referidos antigénios são purificados individualmente antes de serem combinados para formar a vacina. O invento diz respeito, adicionalmente, a um processo para a preparação de vacinas contra a tosse convulsa onde os antigénios estão combinados numa qualquer proporção, incluindo proporções não possíveis em vacinas contra a tosse convulsa totalmente celulares ou acelulares co-purificadas. Os antigénios da tosse convulsa podem estar combinados, adicionalmente, com outros antigénios da tosse convulsa purificados individualmente, componentes estruturais da tosse convulsa, adjuvantes, estabilizadores e componentes de vacina que não sejam da tosse convulsa.

CAMPO DO INVENTO

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de vacinas eficazes contra a Bordetella pertussis que são preparadas por purificação individual de antígenos de tosse convulsa específicos que são depois combinados para formar a vacina. Adicionalmente, a vacina pode conter componentes estruturais da tosse convulsa e componentes de vacina que não sejam da tosse convulsa.

ANTECEDENTES DO INVENTO

A bactéria Bordetella pertussis é o agente causador de pertussis ou tosse convulsa, uma doença infecciosa séria e potencialmente fatal do tracto respiratório superior. As vacinas da tosse convulsa correntemente utilizadas contêm células de B. pertussis totalmente inactivadas por via química. Mais recentemente, foram desenvolvidas vacinas da tosse convulsa acelulares que são baseadas em materiais obtidos por fraccionamento químico e físico de culturas de B. pertussis.

As vacinas totalmente celulares contêm os componentes antigénicos necessários para proporcionar protecção contra a doença tosse convulsa e a sua eficácia em humanos é geralmente bem aceite. Contudo, as vacinas totalmente celulares contêm também componentes que não são requeridos para protecção. Alguns destes componentes, tais como endotoxina, têm sido implicados em efeitos indesejáveis que podem ocorrer simultaneamente com a imunização da tosse convulsa (Bibliografia 1).

As vacinas acelulares são menos complexas do que as vacinas totalmente celulares, porque não têm endotoxina, DNA e

componentes celulares não associados à protecção, tais como enzimas estranhas e outras proteínas. Contudo, as vacinas acelulares, tais como aquelas desenvolvidas pela Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japão (2) e pelo Kanonji Institute, The Research Foundation for Microbial Diseases (Biken) da Osaka University, Japão (3), podem também conter mais componentes do que os necessários para conferir protecção. Adicionalmente, algumas vacinas acelulares são fastidiosas de produzir, por causa de requerem o procedimento de co-purificação (1).

Com base nos estudos de protecção animal, têm sido propostos vários antigénios B. pertussis como antigénios protectores, nomeadamente, factor de promoção de linfocitose (LPF, também conhecido como toxina da tosse convulsa, que é desintoxicado antes de utilização e é em seguida referido como toxóide da tosse convulsa) (1), factor de sensibilização de histamina, ou factor de activação de entrada (4), hemaglutinina filamentosa (FHA) (1), aglutinogénios tais como fímbrias (5) e proteínas de membrana exterior (1), tal como a proteína de membrana exterior de 69 quilodalton (69K) (6).

Cada um destes antigénios é capaz de, individualmente, proteger animais num ou em mais modelos de animal. Contudo, os modelos de animal são de utilização limitada na previsão da eficácia de uma vacina da tosse convulsa em humanos, porque o organismo B. pertussis é um patogénio natural sómente em humanos (7).

Com base nos dados de animais, duas vacinas acelulares desenvolvidas por Biken, uma contendo LPF e FHA, e uma contendo LPF sózinho foram avaliadas em humanos (8,9). Globalmente, as eficácias destas duas vacinas foram inferiores às das vacinas totalmente celulares. As vacinas acelulares Biken foram sómente

58-69% (LPF e FHA) ou 41-55% (sómente LPF) eficazes para conferir protecção quando comparadas a 85-95% de eficácia das vacinas totalmente celulares (8,9). Isto indica que pode ser necessário incluir outros antigénios para obter vacinas da tosse convulsa eficazes.

SUMÁRIO DO INVENTO

As vacinas deste invento não contêm componentes indesejáveis ou estranhos. Em contraste, as vacinas da tosse convulsa totalmente celulares existentes, embora geralmente eficazes, contêm componentes indesejáveis. As vacinas da tosse convulsa acelulares correntes, que são também geralmente eficazes, podem conter mais componentes do que os que são necessários para conferir protecção.

Por consequência, é um objectivo deste invento descrever vacinas da tosse convulsa eficazes que são preparadas por purificação individual de antigénios da tosse convulsa específicos e depois combinação dos antigénios purificados para formar a vacina. A vacina compreende, no mínimo, FHA, LPF e a proteína de 69K.

É um objectivo adicional deste invento descrever vacinas da tosse convulsa em que os antigénios são combinados numa qualquer proporção para optimizar a protecção. Assim, as vacinas podem ter proporções não possíveis em vacinas da tosse convulsa totalmente celulares ou acelulares co-purificadas.

É ainda um outro objectivo deste invento incluir componentes da tosse convulsa individualmente purificados, adicionais, na vacina, tais como a proteína de membrana exterior

de 30 quilodalton e/ou um ou mais aglutinogênios tais como fímbrias.

É um objectivo adicional deste invento melhorar adicionalmente a eficácia da vacina acima por inclusão de outros componentes estruturais da tosse convulsa. Os antigénios da tosse convulsa podem ser conjugados uns com os outros ou com componentes estruturais da tosse convulsa.

É ainda um objectivo adicional deste invento combinar a vacina acima com componentes de vacina que não sejam da tosse convulsa para criar vacinas multivalentes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de vacinas da tosse convulsa eficazes em humanos que estão bem adequadas para a produção à escala comercial, e que representam uma melhoria significativa sobre as vacinas totalmente celulares e acelulares disponíveis correntemente. A purificação individual de antigénios específicos com combinação posterior tem várias vantagens.

Os antigénios podem ser combinados em qualquer proporção desejada, incluindo proporções não possíveis em vacinas totalmente celulares ou acelulares co-purificadas. Assim, pode ser escolhida uma proporção de antigénio que dá a resposta óptima em humanos. Isto está em contraste com as vacinas acelulares que, como misturas de antigénio fraccionado, têm basicamente uma proporção de antigénio fixa. A vacina de dois componentes Biken tem uma proporção FHA:LPF de 50:50 (100 partes totais). A vacina Takeda tem uma proporção FHA:LPF:69K:aglutinogénio de 85:7:7:1.

Ao longo deste pedido, as proporções são baseadas nas proporções em microgramas de antigénios contidos numa dada dose de vacina. As vacinas totalmente celulares estão também limitadas nas proporções de antigénios às gamas presentes nos organismos utilizados.

Os procedimentos de desintoxicação química que são necessários para remover as actividades biológicas indesejadas do LPF podem ser realizados selectivamente só no antigénio LPF antes da combinação dos antigénios numa vacina. Os restantes antigénios, que não requerem um procedimento de desintoxicação, são assim não desnecessariamente expostos aos produtos químicos utilizados para desintoxicação, o que poderia reduzir a sua eficácia como antigénios por destruição da sua estrutura ou conformação, que é responsável pela sua capacidade de conferir protecção. Nas vacinas acelulares co-purificadas disponíveis actualmente, por outro lado, todos os antigénios são sujeitos a um procedimento de desintoxicação química. A vacina resultante deste invento não contém componentes indesejáveis tais como endotoxina.

Quando se considera a produção de vacinas numa escala comercial prática, o número de antigénios numa vacina da tosse convulsa tem de ser limitado. Dependendo do esforço requerido para a purificação dos antigénios individuais, três ou quatro antigénios podem ser um limite. É, contudo, possível que a inclusão de mais antigénios possa aumentar a eficácia da vacina até um certo grau.

Os antigénios incluídos nas vacinas deste invento são identificados por análise da composição da vacina da tosse convulsa acelular Takeda, descrita acima, que mostrou ter uma boa eficácia (81-95%) em humanos (10).

Numa concretização deste invento, a vacina inclui LPF, na sua forma não tóxica (toxóide da tosse convulsa), FHA e a proteína de 69K. Numa outra concretização deste invento, a vacina inclui LPF, FHA, a proteína de 69K e uma proteína de membrana exterior de 30 quilodalton (30K) (11). Adicionalmente, os aglutinogénios tais como fímbrias podem ser incluídos em qualquer uma destas vacinas.

Os componentes da tosse convulsa individuais são ou purificados a partir de B. pertussis nativa utilizando procedimentos de purificação que são conhecidos na literatura e exemplificados abaixo, ou através de outros processos tais como a utilização de técnicas de DNA recombinante para exprimir os componentes individuais. Os antigénios são expressos num organismo hospedeiro adequado tal como um membro do género Bordetella, E. coli, Haemophilus, Streptomyces spec., Bacillus subtilis, levedura, linhas de células de insecto (tais como baculovírus) ou de mamíferos, ou qualquer outro sistema de expressão hospedeiro adequado.

O componente LPF é desintoxicado utilizando uma técnica de desintoxicação química como descrito na literatura (12,13,14). Alternativamente, o LPF pode ser desintoxicado por meio genético através da introdução de mutações dirigidas ao sítio que eliminam as actividades biológicas indesejáveis da toxina (15,16).

Os antigénios purificados individualmente são então misturados na proporção desejada para produzir a vacina. As vacinas deste invento podem também incluir componentes estruturais da tosse convulsa fisiologicamente aceitáveis. Estes componentes podem ser incluídos, com a finalidade de evitar os efeitos secundários ou para intensificar a apresentação dos componentes antigénicos e por conseguinte melhorar a eficácia da vacina.

Exemplos de tais componentes estruturais incluem os polissacáridos, lipopolissacáridos, lípidos, proteínas, glicoproteínas e lipoproteínas.

Os antigénios da tosse convulsa podem ser conjugados uns aos outros ou a componentes estruturais da tosse convulsa utilizando técnicas convencionais. Os componentes podem ser conjugados directamente por aaminação redutora como descrito por Anderson (17). Alternativamente, os componentes podem ser ligados através de um elemento de espaçamento tal como di-hidrazida de ácido adípico como descrito por Gordon (18) ou ácido 6-aminocapróico como descrito por Hilleman et al (19).

Outros componentes de vacina que não seja da tosse convulsa podem ser adicionados por técnicas convencionais para preparar vacinas multivalentes. As vacinas multivalentes são desejáveis, particularmente para lactantes e crianças pequenas, porque reduzem o número de administrações de dosagens necessárias para conferir protecção contra uma série de organismos de doença. Exemplos de tais outros componentes de vacina incluem o toxóide da difteria, toxóide do tétano, poliovírus inactivados, Haemophilus influenzae, conjugados polirribosilfosfato-proteína de Haemophilus, Neisseria meningococcus, Pneumococcus e hepatite B.

Se desejado, a vacina pode também incluir um adjuvante farmacêuticamente aceitável tal como geles de alumínio, geles de cálcio, dipéptidos de muramilo modificados, lípido A de monofosforilo, liposomas, cápsulas de libertação prolongada, ácidos poliglicólicos e poliaminoácidos. Os ácidos poliglicólicos e poliaminoácidos são também úteis para distribuição oral da vacina. Exemplos de geles de alumínio úteis como adjuvantes incluem sais de alumínio precipitados, tais como, fosfato de alumínio e hidróxido de alumínio. Podem ser adicionados

conservantes adequados tais como timerosal, dextrano e glicerina para estabilizar a vacina final. Se se desejar que a vacina esteja na forma injectável, podem ser incluídos diluentes ou veículos imunologicamente aceitáveis de uma forma convencional para preparar soluções ou suspensões líquidas.

As vacinas deste invento são administradas por meios convencionais tais como injeção parentérica (subcutânea ou intramuscular), assim como por administração oral ou intradérmica em seres humanos para induzir uma resposta imune activa para protecção contra a infecção causada por B. pertussis. A dosagem a ser administrada é determinada por meios conhecidos daqueles peritos na arte.

De modo a que este invento possa ser melhor entendido, são expostos a seguir os seguintes exemplos. Os exemplos têm sómente o finalidade de ilustrar e não foram construídos como limitantes do âmbito do invento.

EXEMPLO 1: Purificação do LPF

O LPF é isolado a partir do sobrenadante de cultura de uma cultura de B. pertussis utilizando processos de separação convencionais. Por exemplo, utilizando o processo descrito por Sekura et al. (20), o LPF é isolado primeiro por adsorção do sobrenadante de cultura numa coluna contendo a matriz de gele de ligante corado, Affi-Gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). O LPF é eluído desta coluna com uma concentração elevada de sal, tal como cloreto de magnésio 0,75 M e, após a remoção do sal, é passado através de uma coluna de matriz de afinidade de fetuina-Sepharose composta por fetuina (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) ligado a Sepharose 4B activada com brometo de

cianogénio (CNBr) (Pharmacia, Piscataway, NJ). O LPF é eluído da coluna de fetuina utilizando um sal de magnésio 4 M quer a passo-e-passo quer com um gradiente. A preparação resultante é essencialmente livre de endotoxina e rende uma proteína biologicamente activa que pode ser ensaiada por ensaio de hemaglutinação (HA), ensaio de ADP-ribosilação, ensaio de toxicidade celular de CHO ou outros processos convencionais adequados para determinar a actividade biológica do LPF.

Alternativamente, utilizando o processo de Irons et al. (21), o sobrenadante de cultura é adsorvido numa coluna de Sepharose 4B activada com CNBr à qual a haptoglobina é primeiro covalentemente ligada. O LPF liga-se ao adsorvente a pH 6,5 e é eluído da coluna utilizando um tampão de Tris 0,1 M/NaCl 0,5 M por uma mudança a passo-e-passo para pH 10.

EXEMPLO 2: Desintoxicação do LPF

O LPF purificado por qualquer um dos processos descritos no exemplo 1, é então desintoxicado para remover as actividades indesejáveis que podiam causar reacções secundárias da vacina final. Pode ser utilizado qualquer um de uma variedade de processos de desintoxicação química, convencionais, tal como o tratamento com formaldeído, peróxido de hidrogénio, tetranitrometano ou glutaraldeído.

Por exemplo, o LPF pode ser desintoxicado com glutaraldeído, utilizando uma modificação do procedimento descrito em Munoz et al. (12), de modo que as actividades biológicas residuais não possuam qualquer problema de segurança, enquanto que as propriedades imunogénicas desejadas do LPF são ainda retidas. O LPF purificado é colocado numa solução contendo solução salina

tamponada com fosfato 0,01 M (PBS) (em vez da solução de fosfato de sódio 20 mM com NaCl 0,5 M (pH 7,6) utilizada em Munoz). A solução é tratada com suficiente solução de glutaraldeído 0,2% feita no mesmo tampão para levar a concentração de glutaraldeído a 0,05%. A mistura é incubada à temperatura ambiente durante duas horas e depois é adicionada suficiente solução de L-lisina 0,2M (feita no mesmo tampão) para levar a concentração de L-lisina a 0,02 M. A mistura é incubada adicionalmente durante duas horas à temperatura ambiente e depois dialisada durante dois dias contra PBS 0,01 M (em vez do tampão de fosfato de sódio 20 mM contendo NaCl 0,5 M e L-lisina 0,02 M (pH 7,6) utilizado em Munoz) para completar a desintoxicação.

Se forem utilizadas as técnicas recombinantes (15,16) para preparar uma molécula mutante de LPF que mostra nenhuma ou pouca actividade biológica, pode ser utilizada uma forma moderada destes procedimentos químicos. Por exemplo, uma menor exposição ao produto químico, concentração reduzida do produto químico ou pode ser possível a desintoxicação a uma temperatura inferior. Em alguns casos, o passo de desintoxicação pode ser omitido no seu todo.

EXEMPLO 3: Purificação da FHA

A FHA é purificada a partir do sobrenadante de cultura utilizando uma modificação do processo publicado por Cowell et al. (22). Os promotores de crescimento tais como beta-ciclodextrinas metiladas podem ser utilizados para aumentar o rendimento de FHA nos sobrenadantes de cultura. O sobrenadante de cultura é aplicado a uma coluna de hidroxilapatite. A FHA é adsorvida na coluna, mas o LPF não é. A coluna é lavada extensivamente com Triton X-100 para remover a endotoxina. A FHA é então eluída

utilizando NaCl 0,5 M em fosfato de sódio 0,1 M e, se necessário, passada através de uma coluna de fetuina-Sepharose para remover o LPF residual. A purificação adicional pode envolver a passagem através de uma coluna de Sepharose Cl-6B (Pharmacia, Piscataway, NJ). A FHA é esterilizada por passagem através de um filtro adequado, tal como Millex (Millipore Corporation, Bedford, MA).

Alternativamente, a FHA pode ser purificada utilizando anticorpos monoclonais para o antigénio, onde os referidos anticorpos são fixados a uma coluna de afinidade activada com CNBr (23).

EXEMPLO 4: Purificação da Proteína de Membrana Exterior de 69K

A proteína de membrana exterior de 69K é recuperada a partir de células bacterianas, utilizando o procedimento seguinte: Em sumário, a proteína de 69K é recuperada a partir das células bacterianas primeiro por inactivação das células com um agente bacteriostático tal como timerosal. As células inactivadas são suspensas num meio aquoso tal como PBS (pH 7-8) e submetidas a extracção repetida a temperatura elevada (45-60 C) com subsequente arrefecimento à temperatura ambiente ou a 4 C. As extracções libertam a proteína de 69K das células. O material contendo a proteína de 69K é recolhido por precipitação e passado através de uma coluna Affi-Gel Blue. A proteína de 69K é eluída com uma concentração elevada de sal, tal como cloreto de magnésio 0,5 M. Após diálise, é passada através de um suporte de cromatofocagem tal como uma coluna Polybuffer Exchanger Gel PBE 94 (Pharmacia). As fracções de 69K recuperadas são esterilizadas por filtração através de um filtro adequado tal como Millex.

EXEMPLO 5: Preparação da Vacina

Para preparar um produto de vacina final deste invento, os componentes da tosse convulsa purificados e esterilizados preparados de acordo com os Exemplos 1-4 são primeiro combinados em meio aquoso contendo cloreto de sódio e fosfato de sódio. Depois, se desejado, é adicionado cloreto de alumínio e hidróxido de sódio na presença do conservante timerosal, resultando numa vacina adsorvida que é formada in situ. Alternativamente, pode ser adicionado um adjuvante pré-formado aos componentes activos, quer separadamente quer após os componentes serem combinados. Em ambos os procedimentos, se necessário, o pH é ajustado com hidróxido de sódio a um valor desejado, no intervalo de pH 6,3-7,5. Numa concretização preferida deste invento, a vacina final tem uma proporção FHA:LPF:69K de 57:29:14 (ou 4:2:1 para ser preciso).

EXEMPLO 6: Purificação da Proteína de Membrana Exterior de 30K

A proteína de membrana exterior de 30K é recuperada a partir de células B. pertussis por procedimentos descritos na literatura (11). Em sumário, as células B. pertussis são inactivadas por timerosal, suspensas numa solução aquosa contendo sacarose 2 M, cloridrato de Tris 0,1 M (pH 7,8), EDTA de sódio a 1% (pH 7,0) e lisozima a 1,0%. A suspensão é incubada a 30 C durante uma hora. É adicionada DNase para reduzir a viscosidade que aumenta devido à lise celular. A centrifugação da suspensão a 20000 x g durante uma hora a 30 C dá um sobrenadante que é ajustado a pH 5,0 com HCl 0,2 M e armazenado durante a noite a 40 C para precipitar uma mistura de proteínas. O precipitado é recolhido por centrifugação a 30000 x g durante 15 minutos.

São removidos materiais estranhos pela adição de Triton X-100 a 2% em água e mistura, seguidos pela adição de etanol. A mistura é incubada durante a noite a 4 C e depois centrifugada a 9000 x g durante 20 minutos. O precipitado é lavado com água destilada e a solução é dialisada durante três dias contra PBS. A proteína de 30K é então obtida por cromatografia de permuta iônica DEAE-Sepharose Cl-6B sucessiva (num tampão de Tris HCl, EDTA, Zwitteragente (TEZ) utilizando um gradiente de NaCl de 0 a 1 M para eluição) e cromatografia de filtração em gele Sephacryl S-300 (eluindo com um tampão TEZ). A proteína de 30K é esterilizada por passagem através de um filtro adequado. A proteína de 30K purificada pode então ser combinada com os componentes descritos no Exemplos 1-4 para formar um produto de vacina final deste invento utilizando o procedimento descrito no Exemplo 5.

BIBLIOGRAFIA

1. Manclark, C.R., et al., páginas 69-106, no Bacterial Vaccines, Germanier, R., ed., Academic Press (1984).
2. Patente dos E.U.A. Número 4 455 297.
3. Sato, Y., et al., The Lancet, 122-126 (21 de Jan. de 1984).
4. Yajima, M., et al., J. Biochem., 83, 295-303 (1978).
5. Cowell, J.L., et al., Infection and Immunity, 55, 916-922 (1987).
6. Shahin, R.D., et al., " Immune Protection Mediate by the 69K Outer Membrane Protein of Bordetella pertussis", página 51, Abstracts of the 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology (1989).
7. Kimura, A., et al., Infection and Immunity, 55, 7-16 (1990).
8. Marwick, C., JAMA, 259, 2057-2059 (1988).
9. Kallings, L.O., The Lancet, 955-960 (30 de Abril de 1988).
10. Mortimer, E.A., Jr., The Tokai Journal of Expt'l and Clinical Medicine, 13 Supp., 29-34 (1988).

11. Monji, N., et al., Infection and Immunity, 51, 865-871 (1986).

12. Munoz. J.J., et al., Infection and Immunity, 33, 820-826 (1981).

13. Relyveld, E.H., et al., Methods in Enzymology, 93, 24-60 (1983).

14. Kaslow, H.R., et al., Biochemistry, 26, 4397-4402 (1987).

15. Zealey, G., et al., Vaccines '89, 259-263 (1989).

16. Pizza, M., et al., Science, 246, 497-500 (1989).

17. Patente dos E.U.A. Número 4 673 574.

18. Patente dos E.U.A. Número 4 496 538.

19. Patente dos E.U.A. Número 4 459 286.

20. Sekura, R.D., et al., J. Biol. Chem., 258, 14647-14651 (1983).

21. Irons, L.I., et al., Biochimica et Biophysica Acta, 580, 175-185 (1979).

22. Cowell, J.L., et al., Seminar in Infectious Diseases, 4, 371-379 (1982).

23. Selmer, J.C., Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C, 92, 279-284 (1984).

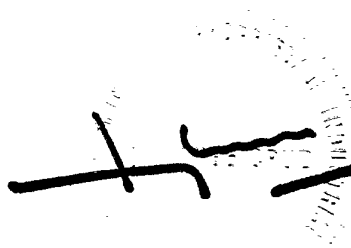
REIVINDICAÇÕES

1ª.- Processo para a preparação de uma vacina eficaz na prevenção da doença provocada pela Bordetella pertussis, caracterizado por se incorporar na referida vacina: a hemaglutinina filamentosa de antigénios da tosse convulsa (FHA), factor de promoção de linfocitose desintoxicado (LPF) e uma proteína de membrana exterior de 69 quilodalton, em que os referidos antigénios são purificados individualmente antes de serem combinados para formar a referida vacina.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os antigénios estarem combinados em qualquer proporção desejada, incluindo proporções não possíveis em vacinas da tosse convulsa totalmente celulares ou acelulares co-purificadas.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por os antigénios FHA, LPF e a proteína de membrana exterior de 69 quilodalton estarem combinados numa proporção de 4:2:1.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se incorporar ainda, na referida vacina, um ou mais dos seguintes antigénios adicionais: (a) um ou mais aglutinogénios da Bordetella pertussis que são purificados individualmente antes de serem combinados com os outros antigénios da tosse convulsa para formar a vacina; ou (b) uma proteína de membrana exterior de 30 quilodalton da Bordetella pertussis que é purificada individualmente antes de ser combinada com os outros antigénios da tosse convulsa para formar a vacina.



5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o aglutinogénio ser fímbria.

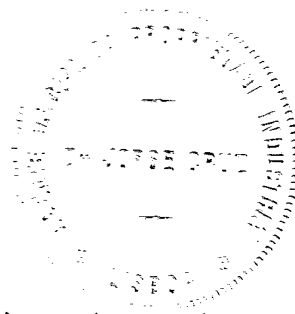
6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se incorporar ainda, na referida vacina, um ou mais componentes estruturais da tosse convulsa fisiologicamente aceitáveis.

7ª. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o componente estrutural da tosse convulsa ser seleccionado a partir do grupo constituído por: polissacaridos, lipopolissacaridos, lípidos, proteínas, glicoproteínas e lipoproteínas.

8ª. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por os antigénios da tosse convulsa serem conjugados uns com os outros ou com um componente estrutural de tosse convulsa.

9ª. - Processo para a preparação de uma vacina multivalente, caracterizado por se incorporar, na referida vacina multivalente, a vacina contra a tosse convulsa preparada de acordo com a reivindicação 1, em combinação com componentes de vacina que não sejam de tosse convulsa.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por os componentes de vacina que não são de tosse convulsa serem um ou mais dos seguintes antigénios adicionais: (a) um ou mais do grupo constituído por vírus de poliomielite inactivados, Haemophilus influenzae, conjugados de polirribosil-



fosfato-proteína de Haemophilus, Neisseria meningococcus, Pneumo-
coccus e hepatite B; ou toxóide da difteria e toxóide do tétano.

Lisboa, 9 de Julho de 1991

J. PEREIRA DA CRUZ

Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA