

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0810778-5 A2**

(22) Data de Depósito: 30/04/2008
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/116
A61P 31/04

(54) Título: KIT, VACINA COMBINADA, E, MÉTODOS DE DIMINUIÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE VIZINHANÇA DE CRM SOBRE UM ANTÍGENO SENSÍVEL EM UM ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO PRIMÁRIA DE UMA VACINA, E DE DIMINUIÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE VIZINHANÇA SOBRE UM ANTÍGENO SENSÍVEL, E, USO DE CONJUGADOS DE SACARÍDEO

(30) Prioridade Unionista: 02/05/2007 GB 0708522.8, 28/06/2007 GB 0712658.4, 05/02/2008 GB 0802108.1

(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

(72) Inventor(es): Jan Poolman

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008055383 de 30/04/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/135514 de 13/11/2008

(57) Resumo: KIT, VACINA COMBINADA, E, MÉTODOS DE DIMINUIÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE VIZINHANÇA DE CRM SOBRE UM ANTÍGENO SENSÍVEL EM UM ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO PRIMÁRIA DE UMA VACINA, E DE DIMINUIÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE VIZINHANÇA SOBRE UM ANTÍGENO SENSÍVEL, E, USO DE CONJUGADOS DE SACARÍDEO. A presente invenção se refere ao campo de vacina e, em particular, à vacinas combinadas e esquemas de co-administração. Os presentes inventores divulgam que uso excessivo de CRM em vacinas pediátricas pode resultar em interferência imune associada a determinados antígenos e fornece soluções para esse problema.

“KIT, VACINA COMBINADA, E, MÉTODOS DE DIMINUIÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE VIZINHANÇA DE CRM SOBRE UM ANTÍGENO SENSÍVEL EM UM ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO PRIMÁRIA DE UMA VACINA, E DE DIMINUIÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE VIZINHANÇA SOBRE UM ANTÍGENO SENSÍVEL, E, USO DE CONJUGADOS DE SACARÍDEO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao campo de vacinas e, em particular, a esquemas de imunização primária e kits para realização de tais esquemas de imunização.

ANTECEDENTES

O número crescente de vacinas recomendadas para administração em esquemas de imunização de bebês de rotina torna o uso de vacinas combinadas essencial de forma a minimizar o desconforto e manter alta conformidade. A incorporação de vacinas recentemente introduzidas será grandemente facilitada se elas foram usadas em combinação com as vacinas atuais. Contudo, vacinas combinadas trazem o risco de os antígenos interferirem com a resposta imune a outros antígenos dentro das vacinas e, da mesma forma, co-administração de diferentes vacinas traz um risco similar. A OMS estabeleceu recentemente no registro epidemiológico Weekly (No. 12, 23 de Março de 2007) que vacinas "não deverão interferir significativamente com a resposta imune a outras vacinas fornecidas simultaneamente". Portanto, há um reconhecimento mundial da importância do monitoramento de respostas nessas situações e minimizar o risco de interferência imune.

CRM-197 é um veículo popular para antígenos sacarídeos e já

tem sido usado em esquemas de imunização primária em vacinas licenciadas incluindo, por exemplo, Prevnar® e Meningitec®. Contudo, o presente inventor descobriu que CRM pode ter um efeito negativo sobre a resposta imune a determinados antígenos, os quais são aqui denominados antígenos sensíveis. O inventor também descobriu outras formas recentemente apreciadas pelas quais a interferência imune pode ocorrer com antígeno sensível e métodos pelos quais essa pode ser diminuída.

A vacinação contra doença pertussis introduzida na década de 1940 tem obtido muito sucesso na redução da morbidade e mortalidade em virtude dessa doença em crianças e bebês. Em países com alta cobertura de vacinação contra pertussis em bebês, esse sucesso tem sido acompanhado, em décadas recentes, por um desvio na epidemiologia da doença para grupos de idade mais velha e para bebês muito jovens, que está em um maior risco de complicações graves.

Esquemas de vacinação que começam a 6 a 8 semanas de idade deixam uma janela de vários meses, onde um bebê não imunizado ou parcialmente imunizado pode estar vulneráveis à infecção por pertussis a partir de contatos íntimos. Vacinação neonatal muito precoce contra pertussis pode ser uma forma de proteger bebês muito jovens, através de redução do período no qual eles estão vulneráveis à doença. Em virtude da imaturidade parcial do sistema imune ao nascimento, imunização neonatal geralmente não leva à rápidas respostas de anticorpo, mas pode resultar em iniciação imunológica eficiente, a qual pode atuar como uma base para futuras respostas (Siegrist CA. Neonatal and early life vaccinology. Vaccine 2001, 19: 3331-3346).

Essa abordagem foi investigada na década de 60 usando a vacina DTPw disponível no momento, a qual resultou em "paralisia imune" temporária, com respostas imunes reduzidas quando comparado com o esquema de vacinação tardia clássico (Provenzano W, Wetterlow LH,

Sullivan CL. Immunization and antibody response in the newborn infant. I - Pertussis inoculation within twenty-four hours of birth. 1965 NEJM; Vol. 273 No. 17: 959-965). A praticabilidade da abordagem usando vacinas combinadas de pertussis acelular DTPa foi depois demonstrada em um estudo pré-clínico por Siegrist e colaboradores (Roduit C, Bozzotti P, Mielcarek N. e colaboradores, Immunogenicity and protective efficacy of neonatal vaccination against Bordetella pertussis in a murine model: evidence for early control of pertussis. Infect Immun Julho de 2002; 70(7): 3521-8).

Os inventores criaram um estudo clínico para avaliar a praticabilidade de uma dose ao nascimento de vacina Pa para acelerar o desenvolvimento das respostas de anticorpo contra pertussis. O efeito da resposta de anticorpo ao esquema de imunização primária foi investigado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O presente inventor descobriu que o uso excessivo de CRM ou outros antígenos fortes (veja definição abaixo), por exemplo, como um veículo conjugado de sacarídeo, pode resultar em respostas imunes a antígenos sensíveis que são reduzidos; surpreendentemente, mesmo se CRM não é conjugado ao antígeno sensível e mesmo se o antígeno sensível e CRM não estão no mesmo recipiente, mas são co-administrados ou administrados de um modo gradual durante imunização primária.

Conseqüentemente, em uma modalidade da invenção, é proporcionado um kit de vacina compreendendo pelo menos nove conjugados de sacarídeo, em que entre dois e sete conjugados de sacarídeo inclusive são conjugados à proteína veículo CRM, o referido kit sendo adequado para uso em um esquema de imunização primária, o referido kit compreendendo:

um primeiro recipiente compreendendo:

a) um conjugado de sacarídeo Hib na presença de CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT, mas o qual não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

b) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo conjugado a CRM; e

c) opcionalmente pelo menos um outro conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT,

5 e um segundo recipiente compreendendo:

d) pelo menos um conjugado de sacarídeo conjugado a CRM;

e) opcionalmente pelo menos um outro conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM,DT ou qualquer outro derivado de DT,

10 e opcionalmente um terceiro recipiente opcionalmente compreendendo pelo menos um conjugado de sacarídeo, em que:

f) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo é conjugado a CRM;

g) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT.

15 A menos que especificamente definido acima, os nove ou mais sacarídeos podem estar distribuídos em qualquer forma entre os recipientes da invenção.

Portanto, onde Hib (um antígeno sensível) está em uma vacina em um primeiro recipiente da invenção na presença de um derivado de DT
20 (por exemplo, DT livre em uma vacina DTP), ele pode ser co-administrado com até 7 conjugados que estão sobre CRM (por exemplo, Prevnar® em um segundo recipiente). Contudo, se um nono ou outro conjugado de sacarídeo é adicionado ao esquema de imunização primária (por exemplo, um sacarídeo de *Neisseria meningitidis*, tal como MenC) nos primeiro, segundo ou terceiro
25 recipientes, então, esse seria conjugado a uma outra proteína veículo que não CRM.

Assim, quando CRM não está presente no mesmo recipiente que o antígeno sensível Hib, a fonte de DT no primeiro recipiente pode ser uma vacina DTP.

A tabela a seguir proporciona exemplos de vacinas as quais podem ser co-administradas usando os kits da invenção, conforme ilustrado na modalidade acima.

1° recipiente	2° recipiente	3° recipiente
Infanrix® hexa	Pprevnar®	MenC(Y)-TT
Infanrix® hexa/MenC(Y)-TT	Pprevnar®	/
Infanrix®-HB-IPV/Hib-MenC(Y)-TT	Pprevnar®	/

A dose média de CRM por conjugado de sacarídeo opcionalmente não excederá uma determinada carga. Portanto, em uma modalidade da invenção, o kit conforme descrito acima contém uma dose média de CRM por conjugado de sacarídeo conjugado a CRM de 1-15 µg, 1-10 µg, 1-5 µg ou 1-3 µg. Em uma outra modalidade da invenção, o kit conforme descrito acima contém uma carga total de CRM de menos de 35 µg, por exemplo, 2-30 µg, 5-25 µg ou 10-20 µg.

Conseqüentemente, nos kits da invenção, 3 dos 9 (ou mais) sacarídeos podem ser conjugados a CRM. Desses 3, um pode ter 2 µg de CRM, um pode ter 4 µg de CRM e um pode ter 6 µg de CRM. Nessa situação, a carga média de CRM no kit é de $12 \mu\text{g}/3 = 4 \mu\text{g}$.

Similarmente, descobriu-se que o antígeno na superfície HB (HB) é um antígeno sensível, por exemplo, a CRM, e o inventor descobriu um limite quanto ao uso de CRM, por exemplo, como um veículo a um sacarídeo, além do qual a resposta imune ao antígeno sensível é reduzida.

Conseqüentemente, em uma outra modalidade da invenção, é proporcionado um kit de vacina compreendendo pelo menos sete conjugados de sacarídeo, em que entre dois e seis conjugados de sacarídeo inclusive são conjugados à proteína veículo CRM, o referido kit sendo adequado para uso em um esquema de imunização primária, o referido kit compreendendo:

um primeiro recipiente compreendendo:

a) HB na presença de CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT, opcionalmente adsorvido sobre fosfato de alumínio;

b) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo

conjugado a CRM; e

c) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT

e um segundo recipiente compreendendo:

5 d) pelo menos um conjugado de sacarídeo conjugado a CRM;

e) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT

e opcionalmente um terceiro recipiente opcionalmente compreendendo pelo menos um conjugado de sacarídeo em que:

10 f) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo é conjugado a CRM;

opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT.

15 Portanto, HB pode estar presente no primeiro recipiente no contexto de uma vacina DTP, tal como Infanrix® hexa, uma vacina de estreptococos 7-valente onde não mais do que 6 sacarídeos são conjugados a CRM pode estar presente no segundo recipiente e MenC-TT pode estar presente no terceiro recipiente.

20 A dose média de CRM por conjugado de sacarídeo opcionalmente não deverá exceder a uma determinada carga. Portanto, em uma modalidade da invenção, o kit conforme descrito acima contém uma dose média de CRM por conjugado de sacarídeo CRM-conjugado de 1-9 µg, 1-6 µg, 1-5 µg ou 1-3 µg. Em uma outra modalidade da invenção, o kit conforme descrito acima contém uma carga total de CRM de menos de 20 µg, por
25 exemplo, 2-18 µg ou 5-15 µg.

Além disso, o inventor sugere uma forma pela qual mais de 7/8 sacarídeos com relação aos antígenos sensíveis HB/Hib podem ser conjugados a CRM e administrados com o(s) antígeno(s) sensível(ies), especificamente certificando-se que o antígeno sensível não está no mesmo

recipiente que uma vacina contendo CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT. Assim, em uma outra modalidade da invenção, é proporcionado um kit de vacina compreendendo pelo menos oito conjugados de sacarídeo conjugados à proteína veículo CRM, adequado para uso em um esquema de imunização primária, o referido kit compreendendo:

um primeiro recipiente compreendendo:

a) um antígeno sensível não na presença de CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT e

b) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT

e um segundo recipiente compreendendo:

c) pelo menos sete, oito, dez, onze, treze, catorze ou quinze conjugados de sacarídeo conjugados a CRM;

d) opcionalmente pelo menos um outro conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM,DT ou qualquer outro derivado de DT

e opcionalmente um terceiro recipiente opcionalmente compreendendo pelo menos um conjugado de sacarídeo em que:

e) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo é conjugado a CRM;

f) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT.

Esse kit tem uma vacina em um primeiro recipiente a qual não está na presença de derivado de DT, por exemplo, não está na presença de uma vacina DTP ou um sacarídeo conjugado a CRM, portanto, não sendo propensa à interferência de vizinhança relacionada e pode ser co-administrada com oito ou mais conjugados CRM-conjugados, por exemplo, um conjugado de sacarídeo pneumocócico 13-valente conjugado a CRM no segundo recipiente ou Prevnar® + MenC-CRM em um segundo/terceiro recipiente.

A tabela a seguir proporciona exemplos de vacinas as quais

podem ser co-administradas usando os kits da invenção, conforme ilustrado na modalidade acima.

1° recipiente	2° recipiente	3° recipiente
Hib ou HB	Prevna® (ou 9, 10, 11, 13 ou mais sacarídeos sobre CRM)	DTP
Hib ou HB	Prevna® + MenC-CRM	DTP
Hib ou HB	Prevna® + DTP	MenC-CRM
Hib ou HB	Prevna® + MenC-CRM + DTP	/
Hib ou HB + MenC-TT	Prevna® (ou 9, 10, 11, 13 ou mais sacarídeos sobre CRM)	DTP
Hib ou HB + MenC-TT	Prevna® + DTP	/
Hib ou HB	Prevna® (ou 9, 10, 11, 13 ou mais sacarídeos sobre CRM) + MenC-TT	DTP
Hib ou HB	Prevna® + DTP	MenC-TT
Hib ou HB	Prevna® (ou 9, 10, 11, 13 ou mais sacarídeos sobre CRM) + MenC-TT + DTP	/

Além disso, o inventor sugere uma forma pela qual aprimorar a redução na resposta imune ao antígeno sensível minimizando o número de sacarídeos que são conjugados a CRM. Assim, em uma outra modalidade da invenção, é proporcionado um kit de vacina compreendendo sete ou mais conjugados de sacarídeo em que menos de sete (por exemplo, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0) conjugados de sacarídeo são conjugados à proteína veículo CRM, o referido kit sendo adequado para uso em um esquema de imunização primária, o referido kit compreendendo:

um primeiro recipiente compreendendo:

a) conjugado de sacarídeo Hib, não conjugados a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

b) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT

e um segundo recipiente compreendendo opcionalmente pelo menos 7 conjugados de sacarídeo em que:

c) menos de sete (por exemplo, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0) sacarídeos conjugados a CRM,

e opcionalmente um terceiro recipiente compreendendo:

d) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT.

5 Tal kit poderia compreender Infanrix® hexa no primeiro recipiente, Synflorix® no segundo recipiente e uma vacina de conjugado de sacarídeo capsular meningocócico no terceiro recipiente.

A tabela a seguir proporciona exemplos de vacinas, onde nenhum antígeno está sobre CRM, as quais podem ser co-administradas usando os kits da invenção, conforme ilustrado na modalidade acima.

Vacina contendo DTP-Hib, tal como Infanrix® hexa	Synflorix®	Men(AW)C(Y)-TT
Hib	Synflorix® + MenC-TT	DTP
Hib	DTP + Synflorix®	MenC-TT
Hib	Synflorix®	DTP + MenC-TT
Hib	DTP + Synflorix® + MenC-TT	/
Hib + MenC-TT	Synflorix®	DTP
HibMenC(Y)(AW)-TT	Synflorix®	DTPaHBIPV
DTPaHBIPVHibMenC(Y)(AW)	Synflorix®	/

10 A tabela a seguir indica quais vacinas deverão e quais não deverão ser co-administradas de acordo com as modalidades da invenção:

Esquemas de imunização primária	Possíveis efeitos de titulação imune
Hexavac® + Prevnar®	HB↓PS6B↓
Infanrix® hexa + Prevnar®	PS6B↑ HB OK
Pediacel® + Prevnar®	PS6B↓
Infanrix® hexa + MenC-CRM	OK
Infanrix® penta + MenC-CRM	OK
Pediacel® + MenC-CRM	OK
Infanrix®-Hib + MenC-CRM	Hib↓
Hexavac® + MenC-TT	Hib↑
Infanrix® hexa + MenC-TT	Hib↑
Pediacel® + MenC-TT	Hib↑
Pediacel® + Prevnar® + MenC-CRM	Hib↓
DTPa + HibMenC(Y)-TT	OK
DTPa(HB)IPVHib + Synflorix®	Hib↑
Infanrix®-HB-IPV/Hib-MenC(Y)-TT + Synflorix®*	OK

Infanrix®-HB-IPV/Hib-MenC(Y)-TT Pprevnar®*	+	Hib↓
DTPa(HBIPV)Hib + 13v Pprevnar		Hib↓
Pa ao nascimento, então, Infanrix® hexa		Hib↓ HB↓ (veja exemplo 3)

*Hipóteses fornecidas nos princípios esboçados aqui, contudo, ainda a serem testadas.

↑ e ↓ significam que a resposta ao antígeno relevante é aumentada ou diminuída, respectivamente, comparado a se a vacina contendo DTP (por exemplo, Infanrix® hexa) é administrada sem quaisquer outras vacinas (isto é, não é co-administrada).

5 Em uma outra modalidade da presente invenção, é proporcionado uma vacina combinada adequada para imunização primária compreendendo nove ou mais conjugados de sacarídeo:

a) em que Hib conjugado de sacarídeo está presente, mas não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

10 b) em que entre dois e sete conjugados de sacarídeo inclusive são conjugados a CRM;

c) em que um ou mais de outro(s) conjugado(s) de sacarídeo(s) não é conjugado a CRM.

A dose média de CRM por conjugado de sacarídeo
15 opcionalmente não excederá a uma determinada carga. Portanto, em uma modalidade da invenção, a vacina combinada conforme descrito acima contém uma dose média de CRM por conjugado de sacarídeo CRM-conjugado de 1-15 µg, 1-10 µg, 1-5 µg ou 1-3 µg. Em uma outra modalidade da invenção, a combinação conforme descrito acima contém uma carga total
20 de CRM de menos de 35 µg, por exemplo, 2-30 µg, 5-25 µg ou 10-20 µg.

Em uma outra modalidade da presente invenção, é proporcionada uma vacina combinada adequada para imunização primária compreendendo sete ou mais sacarídeos:

a) em que HB está presente;

25 b) em que entre dois e seis conjugados de sacarídeo inclusive são conjugados a CRM;

c) em que um ou mais de outro(s) conjugado(s) de sacarídeo(s)

não são conjugado(s) a CRM.

A dose média de CRM por conjugado de sacarídeo opcionalmente não excederá uma determinada carga. Portanto, em uma modalidade da invenção, a vacina combinada conforme descrito acima contém uma dose média de CRM por conjugado de sacarídeo CRM-conjugado de 1-9 µg, 1-6 µg, 1-5 µg ou 1-3 µg. Em uma outra modalidade da invenção, a combinação conforme descrito acima contém uma carga total de CRM de menos de 20 µg, por exemplo, 2-18 µg ou 5-15 µg.

IPV pode ser administrado junto com o antígeno sensível em kits ou vacinas combinadas da invenção, uma vez que ele tem um efeito positivo sobre a resposta imune ao antígeno sensível (isto é, ele atua como um modulador - veja definição). Para tais efeitos positivos, é importante que a vacina contra IPV esteja presente no mesmo recipiente que o antígeno sensível. Pw pode, similarmente, atuar como um modulador imune.

Portanto, em uma modalidade, é proporcionado um kit ou vacina combinada da invenção em que o recipiente com o antígeno sensível ainda compreende IPV.

Em uma outra modalidade, é proporcionado um kit ou vacina combinada da invenção em que o recipiente com o antígeno sensível ainda compreende Pw.

Em uma outra modalidade, é proporcionado um método de administração dos kits ou vacinas combinadas da invenção.

Em uma modalidade da presente invenção, é proporcionado um método de diminuição da interferência de vizinhança de CRM sobre um antígeno sensível em um esquema de imunização primária de uma vacina compreendendo uma ou mais das seguintes etapas:

a) diminuição da quantidade de CRM e/ou número de conjugados sobre CRM na vacina (por exemplo, a 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0);

b) inclusão de IPV na vacina compreendendo o antígeno

sensível;

c) inclusão de Pw na vacina compreendendo o antígeno sensível;

d) diminuição da dose de DT na vacina compreendendo o antígeno sensível;

e) aumento da dose do antígeno sensível;

f) se Pa está presente na vacina compreendendo antígeno sensível, redução da dose de Pa ou número de componentes de Pa;

g) remoção de CRM da vacina compreendendo o antígeno sensível ou remoção de CRM totalmente do kit ou remoção de CRM, DT e derivados de DT da vacina compreendendo o antígeno sensível.

Em uma outra modalidade da presente invenção, é proporcionado um método de diminuição da interferência de vizinhança sobre um antígeno sensível quando de uso de um kit compreendendo oito ou mais conjugados de sacarídeo conjugados a CRM, compreendendo um primeiro recipiente compreendendo:

a) um antígeno sensível(s) na presença de CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

e um segundo recipiente compreendendo:

b) sete ou mais conjugados de sacarídeo conjugados a CRM;

c) opcionalmente pelo menos um outro conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

e opcionalmente um terceiro recipiente opcionalmente compreendendo pelo menos um conjugado de sacarídeo o qual é:

d) opcionalmente conjugado a CRM;

e) opcionalmente não conjugado a CRM,

compreendendo a etapa de remoção de todo CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT do recipiente compreendendo o antígeno sensível ou redução do número de conjugados de sacarídeo conjugados a

CRM para não mais do que sete (por exemplo, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0).

Em uma outra modalidade da presente invenção é proporcionado um método de imunização contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* usando o kit ou vacina combinada da invenção, em que;

a) cada antígeno no kit ou na vacina combinada é administrado 2-3 vezes em um esquema de imunização primária;

b) Hib não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

c) existem 7 ou mais conjugados de antígeno sacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae*;

d) há um ou mais conjugados de antígeno de sacarídeo capsular neisserial;

e) o número de antígenos de sacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* conjugados a CRM é menor do que 8.

Em uma outra modalidade da presente invenção é proporcionado um método de imunização contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* usando o kit ou vacina combinada da invenção, em que:

a) cada antígeno no kit ou vacina combinada é administrada 2-3 vezes em um esquema de imunização primária;

b) a dose de Pa ou número de componentes Pa é reduzido.

O presente inventor observou que antígenos de Pa têm um efeito negativo sobre a resposta imune aos antígenos sensíveis.

Portanto, em uma modalidade, é proporcionado um kit, vacina combinada ou método da invenção em que, se Pa está presente, PT (ou derivado de PT) está presente em Pa em uma dose a qual não excede 10 µg, 1-9, 1,5-8, 2-6, 2,5-5 µg por dose de 0,5 mL.

5 Em uma outra modalidade é proporcionado um kit, vacina combinada ou método da invenção em que, se Pa está presente, FHA está presente em Pa em uma dose a qual não excede 10 µg, 1-9, 1,5-8, 2-6, 2,5-5 µg por dose de 0,5 mL.

10 Em uma outra modalidade é proporcionado um kit, vacina combinada ou método da invenção em que, se Pa está presente, PRN está presente em Pa em uma dose a qual não excede 6 µg, 0,5-6, 0,8-5, 1-4, 2-3 µg por dose de 0,5 mL.

15 Em uma outra modalidade é proporcionado um kit, vacina combinada ou método da invenção em que, se Pa está presente PT está presente em Pa em uma dose de aproximadamente 2,5 µg, FHA está presente em Pa em uma dose de aproximadamente 2,5 µg e PRN está presente em Pa em uma dose de aproximadamente 0,8 µg por dose de 0,5 mL.

20 Em uma outra modalidade é proporcionado um kit, vacina combinada ou método da invenção em que, se Pa está presente PT está presente em Pa em uma dose de aproximadamente 5 µg, FHA está presente em Pa em uma dose de aproximadamente 5 µg e PRN está presente em Pa em uma dose de aproximadamente 2,5 µg por dose de 0,5 mL.

DEFINIÇÕES

25 **Aproximadamente ou em torno:** $\pm$ 10% do valor estabelecido, mas deverá ser mantido com o contexto de uso.

Interferência associada: O efeito sobre a resposta imune a um antígeno sensível (tal como sacarídeo capsular Hib ou antígeno na superfície de Hepatite B) quando antígeno(s) forte(s), tal como CRM197, são administrados junto com antígeno(s) sensível(is). Tal interferência pode ser

observada mesmo se os antígenos forte e sensível não são administrados no mesmo recipiente de vacina, mas são co-administrados ou administrados em um esquema de imunização primária gradual. Por exemplo, CRM co-administrado com uma composição compreendendo antígeno sensível e DT.

5 **Co-administração:** A administração de dois ou mais antígenos em vacinas distintas administradas ao mesmo ou em locais diferentes durante o mesma visita ao médico. Comumente, múltiplas vacinas são administradas em diferentes locais - isto é, locais de drenagem a diferentes nódulos linfáticos, por exemplo, diferentes membros. Embora
10 opcionalmente esse não precise ser o caso (vacinas podem ser administradas em locais de drenagem ao mesmo nódulo linfático).

Vacina combinada: uma vacina que confere proteção contra duas ou mais doenças usando duas ou mais porções antigênicas distintas.

CRM: Qualquer mutante de toxina de difteria que desintoxica
15 a toxina do tipo silvestre e o qual não foi quimicamente desintoxicado. CRM-197 é um mutante de DT comumente usado. Outros mutantes de DT também podem incluir CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida e colaboradores, J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM 102, CRM 103 e CRM 107 e outras mutações descritas por Nicholls e Youle em Genetically
20 Engineered Toxins, Ed: Frankel, Marcel Dekker Inc, 1992; deleção ou mutação de Glu-148 para Asp, Gln ou Ser e/ou Ala 158 para Gly e outras mutações divulgadas no US 4709017 ou US 4950740; mutação de pelo menos um ou mais resíduos Lys 516, Lys 526, Phe 530 e/ou Lys 534 e outras mutações divulgadas no US 5917017 ou US 6455673; ou fragmentos
25 divulgados no US 5843711. CRM não abrange toxina de difteria, toxóide de difteria ou toxóides de mutantes de difteria.

Derivado de DT: Um antígeno o qual é um mutante desintoxicado de toxina de difteria (por exemplo, CRM - veja acima) ou uma forma quimicamente desintoxicada de toxina de difteria ou CRM ou qualquer

outro mutante ou truncado de toxina de difteria o qual retém a função de estimulação de anticorpos os quais se ligam especificamente à toxina de difteria.

Hexavac®: Vacina combinada inativada para pólio - difteria - tétano acelular - pertussis - hepatite B - *Haemophilus influenzae* tipo b (vacina DTPa-IPV-HB/Hib, Sanofi-Aventis). Ela contém 20IU de DT, 40IU de TT, 25 µg de PT, 25 µg de FHA, 40 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 1, 8 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 2 e 32 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 3, 12 µg de PRP, 5 µg de HBsAg.

Hib: Sacarídeo capsular de RP conjugado a uma proteína veículo. Kits ou vacinas combinadas da invenção podem compreender 1-10 µg de sacarídeo (por exemplo, 2-8 µg, 3-7 µg, 4-6 µg) por dose, conjugado com ou sem um ligante, tal como ADH. Exemplo de Hib é o antígeno contido nas vacinas Hib conjugadas conhecidas, tal como Hiberix® (GlaxoSmithKline Biologicals s.a.). Várias proteínas veículo podem ser usadas na Hib da invenção, por exemplo, TT ou NTHi PD (EP 0594610). Outra proteína veículo possível na Hib da invenção é OMC ou OMP (complexo de proteína da membrana externa) de *Neisseria meningitidis* (por exemplo, conforme para o conjugado Hib-OMC dentro da PedvaxHIB da Merck & Co. Inc).

Modulador imune: Antígeno administrado em uma vacina que, quando administrado junto com um antígeno sensível e um antígeno forte, melhora a resposta imune à doença causada pelo organismo do qual o antígeno sensível é derivado comparado com se o antígeno sensível é administrado junto com o antígeno forte apenas. Exemplos incluem IPV e Pw.

Infanrix® hexa: Vacina combinada inativada de difteria - tétano acelular - pertussis - hepatite B - pólio - *Haemophilus influenzae* tipo b (vacina DTPa-HBV-IPV/Hib, GlaxoSmithKline). Ela contém pelo menos 30 unidades internacionais (IU) de DT, pelo menos 40IU de TT, 25 µg de PT, 25

µg de FHA, 8 µg de PRN, 10 µg de antígeno na superfície de Hepatite B (HBsAg), 40 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 1, 8 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 2, 32 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 3 e 10 µg de fosfato de poliribosil ribitol (PRP) conjugados a TT.

5 **Infanrix® penta:** Vacina combinada inativada de difteria - tétano acelular - pertussis - hepatite B - pólio (vacina DTPa-HBV-IPV, GlaxoSmithKline). Ela contém pelo menos 30 IU de DT, pelo menos 40IU de TT, 25 µg de PT, 25 µg de FHA, 8 µg de PRN, 10 µg de HBsAg, 40 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 1, 8 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 2 e 32 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 3.

10 **Kit:** Vacinas em recipientes distintos podem ser embaladas junto com instruções para seu uso conjunto (mas não no sentido de mistura dos conteúdos dos recipientes antes de administração). Alternativamente, vacinas podem ser embaladas separadamente com instruções de como elas
15 podem ser usadas com outras vacinas descritas nos kits da invenção. Vacinas nos kits da invenção podem ser coloridas ou numeradas ou adotar outros sistemas para que os médicos reconheçam prontamente quais vacinas/recipientes deverão ser administrados juntos nos kits da invenção e como e quando eles deverão ser administrados (co-administrados ou
20 administração gradual em um esquema de imunização primária).

Opcionalmente: aqui, em cada caso, se destina a ser a base expressa para a característica opcional mencionada que está presente ou está ausente.

Pa: Vacina para pertussis acelular, tipicamente
25 compreendendo PT, FHA e PRN e opcionalmente aglutinogênios 2 e 3.

Pediacel®: Vacina combinada inativada para difteria - tétano - pertussis acelular - pólio - *Haemophilus influenzae* tipo b (vacina DTPa-IPV/Hib, Sanofi-Aventis). Ela contém pelo menos 30IU de DT, pelo menos 40IU de TT, 20 µg de PT, 20 µg de FHA, 3 µg de PRN, 5 µg de FIM2 e

FIM3, 40 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 1, 8 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 2 e 32 unidades de antígeno D de poliovírus do tipo 3 e 10 µg de PRP conjugados a TT.

5 **Pprevnar®:** Uma vacina 7 valente de *Streptococcus pneumoniae* consistindo de sacarídeos capsulares derivados dos seguintes sorotipos: conjugados 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, todos conjugados a CRM-197 (Wyeth).

10 **Pprevnar 13-valente:** Uma vacina 13 valente de *Streptococcus pneumonia* consistindo de sacarídeos capsulares conjugados a CRM-197 (Wyeth).

15 **Imunização primária:** Um esquema de imunizações usualmente no primeiro ano de vida, freqüentemente compreendido de 2 ou 3 imunizações para cada antígeno, por exemplo, a 2, 4, 6 meses ou 1, 3, 5 meses ou 2, 3, 4 meses. Os antígenos podem ser co-administrados (fornecidos na mesma visita, usualmente em diferentes membros e, assim, usualmente drenando para diferentes nódulos linfáticos) ou administrada em um protocolo gradual. Co-administração é usualmente preferida, uma vez que ela envolve menos visitas ao médico e, portanto, resulta em melhor conformidade.

20 **PS6B:** Conjugado de polissacarídeo capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B.

Derivado de PT: toxina toxóide de pertussis ou, alternativamente, um mutante que é desintoxicado e, portanto, não precisa ser quimicamente desintoxicado.

25 **Sacarídeo:** Pode indicar polissacarídeo ou oligossacarídeo e inclui ambos. Sacarídeo freqüentemente se refere ao antígeno sacarídeo capsular de bactérias patogênicas, por exemplo, *Haemophilus influenzae b*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e pode ser um polissacarídeo de comprimento total ou pode ser 'sacarídeos dimensionados' ou 'oligossacarídeos' bacterianos (os quais têm, naturalmente, um baixo

número de unidades de repetição ou os quais são polissacarídeos com tamanho reduzido para facilidade de manipulação, mas ainda são capazes de induzir a uma resposta imune protetora em um hospedeiro), os quais são bem conhecidos na técnica de vacina (veja, por exemplo, EP 497525).

5 **Antígeno sensível:** Antígeno particularmente suscetível à interferência imune - em particular interferência de vizinhança em um esquema de imunização primária. Antígeno administrado em uma vacina que, quando administrado junto com um antígeno forte (veja abaixo) proporciona uma resposta imune reduzida à doença causada pelo organismo do qual o
10 antígeno é derivado, comparado com se o antígeno sensível é administrado em si. Exemplos incluem antígeno na superfície de Hepatite B, *Haemophilus influenzae* b e PS6B.

Administração gradual: A administração de dois ou mais antígenos em um esquema de imunização primária vacinas distintas durante
15 diferentes visitas ao médico. Essas administrações são, tipicamente, espaçadas em 1-4 semanas ou mais.

Antígeno forte: Antígeno administrado em uma vacina que, quando administrado junto com (ou ao mesmo tempo em que) um antígeno sensível resulta em uma resposta imune reduzida à doença causada pelo
20 organismo do qual o antígeno sensível é derivado, comparado com se o antígeno sensível é administrado em si. Exemplos incluem Pa, CRM-197.

Synflorix®: Uma vacina 10 valente de *Streptococcus pneumoniae* consistindo dos 5 conjugados a seguir: conjugados PS1-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT e PS23F-PD (por exemplo, em uma dose de 1, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1 µg de sacarídeo, respectivamente, por dose humana) (GlaxoSmithKline) (veja,
25 por exemplo, WO2007/071707).

DESCRIÇÃO DETALHADA

Antígenos nos kits e vacina combinada da invenção estarão

presentes em "quantidades imunologicamente eficazes", isto é, a administração dessa quantidade a um indivíduo, seja em uma única dose ou como parte de uma série, é eficaz para tratamento ou prevenção de doenças. Tratamento de dosagem é conforme os esquemas de imunização primária
5 aceitos, seguidos por doses de reforço, conforme necessário.

Componentes da vacina DTP

A vacina DTP da invenção confere proteção contra doenças causadas por *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* e *Bordetella pertussis*. Ela é comumente compreendida de toxóide de difteria (DT),
10 toxóide do tétano (TT) e pertussis de célula inteira (Pw) ou pertussis acelular (Pa), o qual é compreendido de um ou mais componentes, conforme descrito abaixo.

O antígeno de difteria é, tipicamente, um toxóide de difteria. O preparo de toxóides de difteria (DT) é bem documentado. Qualquer toxóide
15 de difteria adequado pode ser usado. Por exemplo, DT pode ser produzido através de purificação da toxina de uma cultura de *Corynebacterium diphtheriae*, seguido por desintoxicação química mas, alternativamente, é feito através de purificação de um análogo recombinante ou geneticamente desintoxicado da toxina (por exemplo, CRM197 ou outros mutantes,
20 conforme descrito na US 4.709.017, US 5.843.711, US 5.601.827 e US 5.917.017). Em uma modalidade, o toxóide de difteria da invenção pode ser adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como hidróxido de alumínio. Em outra modalidade, o toxóide de difteria da invenção pode ser adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como fosfato de alumínio. Em uma outra modalidade,
25 o toxóide de difteria pode ser adsorvido sobre uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Os kits ou vacina combinada da invenção usualmente compreendem DT em uma dose de entre 10-120 µg, 50-100 µg, 70-100 µg ou 80-95 µg.

O antígeno de tétano da invenção é, tipicamente, um toxóide

do tétano. Métodos de preparo de toxóides do tétano (TT) são bem conhecidos na técnica. Em uma modalidade, TT é produzido através de purificação da toxina de uma cultura de *Clostridium tetani*, seguido por desintoxicação química mas, alternativamente, seguido por desintoxicação química mas, alternativamente, é feito através de purificação de um análogo recombinante ou geneticamente desintoxicado da toxina (por exemplo, conforme descrito no EP 209281). Qualquer toxóide de tétano adequado pode ser usado. 'Toxóide de tétano' pode abranger fragmentos da proteína de comprimento total (por exemplo, Fragmento C - veja EP 478602). Em uma modalidade, o toxóide de tétano da invenção pode ser adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como hidróxido de alumínio. Em outra modalidade, o toxóide de tétano da invenção pode ser adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como fosfato de alumínio. Em uma outra modalidade, o toxóide de tétano pode ser adsorvido sobre uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio.

Os kits ou vacina combinada da invenção usualmente compreendem TT em uma dose de entre 10-60 µg, 20-50 µg ou 30-48 µg.

O componente pertussis da invenção pode ser acelular (Pa), onde antígenos de pertussis purificados são usados ou de célula inteira (Pw) onde pertussis de célula inteira morto é usado como o componente pertussis.

Pa da invenção pode ser compreendido de um ou mais dos seguintes: toxóide Pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN), aglutinogênios fimbriais FIM2 e FIM3. Em particular, ele pode compreender PT, FHA, PRN, FIM2 ou FIM3 ou de PT+FHA, PT+PRN, PT+FIM2, PT+FIM3, FHA+PRN, FHA+FIM2, FHA+FIM3, PRN+FIM2, PRN+FIM3 ou FIM2+FIM3 ou de PT+FHA+PRN, PT+FHA+FIM2, PT+FHA+FIM3, PT+PRN+FIM2, PT+PRN+FIM3, PT+FIM2+FIM3, FHA+PRN+FIM2, FHA+PRN+FIM3, FHA+FIM2+FIM3 ou PRN+FIM2+FIM3 ou de PT+FHA+PRN+FIM2, PT+FHA+PRN+FIM3 ou FHA+PRN+FIM2+FIM3 ou de PT+FHA+PRN+FIM2+FIM3.

Os kits ou vacina combinada da invenção podem compreender PT desintoxicado através de um método bem conhecido de tratamento com formaldeído ou por meio de mutações (derivado de PT). Descobriu-se que substituições de resíduos dentro da subunidade S1 da proteína resultam em uma proteína a qual retém as propriedades imunológicas e protetoras do P, mas com toxicidade reduzida ou nenhuma (EP 322533). Tais mutantes podem ser usados em doses menores do que 20-25 µg.

Em uma modalidade da invenção, componentes de Pa estão presentes em doses comumente usadas em vacinas licenciadas (por exemplo, Infanrix®), tal como aproximadamente 25 µg de PT, 25 µg de FHA e 8 µg de PRN.

Pw da invenção é compreendido de pertussis de células inteiras. Pw pode ser inativado através de vários métodos, incluindo métodos sem mercúrio. Tais métodos incluem inativação com calor (por exemplo, 56°C, 10 minutos), formaldeído (por exemplo, 0,1% a 37°, 24 horas), glutaraldeído (por exemplo, 0,05% em temperatura ambiente, 10 minutos), acetona-I (por exemplo, três tratamentos em temperatura ambiente) e acetona-II (por exemplo, três tratamentos em temperatura ambiente e um quarto tratamento a 37°C) (veja, por exemplo, Gupta e colaboradores, 1987, J. Biol. Stand. 15: 87; Gupta e colaboradores, 1986, Vaccine, 4: 185). Métodos de preparo de *Bordetella pertussis* (Pw) de célula inteira morta adequado para a presente invenção são divulgados no WO 93/24148, assim como métodos de formulação para produção de vacinas DT-TT-Pw-HepB. Tiomersal foi usado no passado no preparo de *Bordetella pertussis* de células inteiras mortas. Contudo, em uma modalidade, ele não é usado no processo de formulação das vacinas da presente invenção.

Uma dose de Pw de 5-50 IOU, 7-40 IOU, 9-35 IOU, 11-30 IOU, 13-25 IOU, 15-21 IOU ou em torno de ou exatamente IOU é tipicamente usada.

Em uma modalidade, o componente pertussis da invenção pode estar adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como hidróxido de alumínio. Em outra modalidade, o componente pertussis da invenção pode estar adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como fosfato de alumínio. Em
5 uma outra modalidade, o componente pertussis pode estar adsorvido sobre uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio.

Componentes da vacina contra IPV

IPV da invenção pode compreender polio vírus do tipo 1 (por exemplo, Mahoney ou Brunhilde), tipo 2 (por exemplo, MEF-1) ou tipo 3
10 (por exemplo, Saukett) ou uma combinação de dois ou todos três desses tipos. Os kits ou a vacina combinada da invenção pode ser compreendida de IPV tipo 1 ou IPV tipo 2 ou IPV tipo 3 ou IPV tipos 1 e 2 ou IPV tipos 1 e 3 ou IPV tipos 2 e 3 ou IPV tipos 1, 2 e 3.

Métodos de preparo de poliovírus inativado (IPV) são bem
15 conhecidos na técnica. Em uma modalidade, IPV compreenderá os tipos 1, 2 e 3, conforme é comum na técnica de vacina e pode ser a vacina de polio Salk a qual é inativada com formaldeído (veja, por exemplo, Sutter e colaboradores, 2000, *Pediatr. Clin. North Am.* 47: 287; Zimmerman & Spann 1999, *Am Fam Physician* 59: 113; Salk e colaboradores, 1954, *Official Monthly Publication of the American Public Health Association* 44(5): 563; Hennesen, 1981, *Develop. Biol. Standard* 47: 139; Budowsky, 1991, *Adv. Virus Res.* 39: 255).
20

Em uma modalidade, o IPV não é adsorvido (por exemplo, antes de mistura com outros componentes se presentes). Em outra modalidade, o(s) componente(s) IPV da invenção pode ser adsorvido sobre
25 um sal de alumínio, tal como hidróxido de alumínio (por exemplo, antes ou após mistura com outros componentes se presentes). Em outra modalidade, o(s) componente(s) IPV da invenção pode estar adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como fosfato de alumínio.

Em uma outra modalidade, o(s) componente(s) IPV pode estar

adsorvido sobre uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Se adsorvido, um ou mais componentes IPV podem ser adsorvidos separadamente ou juntos como uma mistura. IPV pode ser estabilizado através de um processo de secagem particular, conforme descrito no WO2004/039417.

Poliovírus pode ser crescido em cultura de célula. A cultura de célula pode ser uma linhagem de célula VERO ou PMKC, a qual é uma linhagem de célula contínua derivada de rim de macaco. Células VERO podem, convenientemente, ser microveículos cultivados. Cultura de células VERO antes e durante infecção viral pode envolver o uso de material bovino-derivado, tal como soro de bezerro, e essa material será obtido de fontes as quais são isentas de encefalite espongiforme bovina (BSE). Cultura também pode envolver materiais tais como hidrolisato de lactalbumina. Após crescimento, vírions podem ser purificados usando técnicas tais como ultrafiltração, diafiltração e cromatografia. Antes de administração aos pacientes, os vírus devem ser inativados e isso pode ser obtidos através de tratamento com formaldeído.

Vírus podem ser crescidos, purificados e inativados individualmente e, então, combinados para proporcionar uma mistura densa para uso em vacina contra IPV ou para adição aos antígenos adsorvidos de difteria e pertussis e componentes pertussis para vacinas compreendendo DTPw-IPV ou DTPa-IPV.

Doses padrões de vacinas polio hoje tendem a conter 40 unidades de antígeno D de poliovírus inativado do tipo 1, 8 unidades de antígeno D de poliovírus inativado do tipo 2 e 32 40 unidades de antígeno D de poliovírus inativado do tipo 3 (por exemplo, Infanrix®-IPV™).

Em uma modalidade, uma dose de vacina contra IPV da presente invenção pode compreender 10-36 unidades de antígeno D de IPV tipo 1.

Em uma modalidade, uma dose de vacina contra IPV da presente invenção pode compreender 2-7 unidades de antígeno D de IPV tipo 2. 20

Em uma modalidade, uma dose de vacina contra IPV da presente invenção pode compreender 8-29 unidades de antígeno D de IPV tipo 3.

Antígeno de Hepatite B

O preparo de antígeno na superfície de Hepatite B (HBsAg) é bem documentado. Veja, por exemplo, Hartford e colaboradores, 1983, Develop. Biol. Standard 54: 125, Gregg e colaboradores, 1987, Biotechnology 5: 479, EP0226846, EP0299108. Ele pode ser preparado como segue. Um método envolve purificação do antígeno na forma de partícula do plasma de portadores de hepatite B crônica, uma vez que grandes quantidades de HBsAg são sintetizadas no fígado e liberadas na corrente sanguínea durante uma infecção por HBV. Outro método envolve expressão da proteína através de métodos de DNA recombinante. O HBsAg pode ser preparado através de expressão no levedo *Saccharomyces cerevisiae*, pichia, células de inseto (por exemplo, Hi5) ou célula de mamífero. O HBsAg pode ser inserido em um plasmídeo e sua expressão pode ser controlada por um promotor, tal como o promotor "GAPDH" (do gene de desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato). O levedo pode ser cultivado em um meio sintético. HBsAg pode, então, ser purificado através de um processo envolvendo etapas tais como precipitação, cromatografia de troca de íons e ultrafiltração. Após purificação, HBsAg pode ser submetido à diálise (por exemplo, com cisteína). O HBsAg pode ser usado em uma forma de partícula.

Conforme usado aqui, a expressão "antígeno na superfície de Hepatite B" ou "HBsAg" inclui qualquer antígeno HBsAg ou fragmento do mesmo mostrando a antigenicidade do antígeno na superfície de HBV. Deve ser entendido que, além da sequência de 226 aminoácidos do antígeno S de

HBsAg (veja Tiollais e colaboradores, 1985, Nature 317: 489 e referências no mesmo), HBsAg, conforme descrito aqui pode, se desejado, conter toda ou parte de uma pré-seqüência S, conforme descrito nas referências acima e no EP0278940. Em particular, o HBsAg pode compreender um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido compreendendo os resíduos 133-145, seguido pelos resíduos 175-400 da L proteína de HBsAg com relação à rede de leitura aberta sobre um vírus da Hepatite B do sorotipo ad (esse polipeptídeo é referido como L*; veja EP0414374). HBsAg, dentro do escopo da invenção, também pode incluir o polipeptídeo préS1-preS2-S descrito no EP0198474 (Endotronics) ou análogos do mesmos, tais como aqueles descritos no EP0304578 (McCormick e Jones). HBsAg, conforme descrito aqui, também pode se referir a mutantes, por exemplo, o "mutante de escape" descrito no WO 91/14703 ou EP0511855A1, especialmente HBsAg em que a substituição de aminoácido na posição 145 é arginina para glicina.

O HBsAg pode estar na forma de partícula. As partículas podem compreender, por exemplo, proteína S apenas ou podem ser partículas compostas, por exemplo, L*, S) onde L* é conforme definido acima e S denota a proteína S de HBsAg. A referida partícula está, vantajosamente, em uma forma na qual ela é expressa em levedo.

Em uma modalidade, HsAg é o antígeno usado na EngerixB® (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), a qual é ainda descrita no W093/24148.

Antígeno na superfície de hepatite B pode ser adsorvido sobre fosfato de alumínio, o que pode ser feito antes de mistura com outros componentes (descrito no W093/24148). O componente de hepatite B deverá ser substancialmente isento de tiomersal (método de preparo de HBsAg sem tiomersal foi previamente publicado no EP1307473).

Os kits ou vacina combinada da invenção pode compreender HB em uma dose de aproximadamente 10 µg.

Antígeno(s) de *Haemophilus influenzae b*

Vaccines compreendendo antígenos de *Haemophilus influenzae* tipo b foram descritas no WO97/00697. As vacinas da invenção podem usar qualquer antígeno Hib adequado. O antígeno pode ser sacarídeo capsular (PRP) de Hib conjugado a ou misturado com uma proteína veículo.

- 5 O sacarídeo é um polímero de ribose, ribitol e fosfato. O antígeno Hib pode opcionalmente ser adsorvido sobre fosfato de alumínio, conforme descrito no WO97/00697 ou pode estar não adsorvido, conforme descrito no WO02/00249 ou pode não ter sofrido um processo específico de adsorção.

- 10 Por um antígeno sendo 'não adsorvido sobre sal adjuvante de alumínio' aqui entenda-se que uma etapa de adsorção expressa ou dedicada para o antígeno sobre sal adjuvante de alumínio fresco não está envolvido no processo de formulação da composição.

- Hib pode ser conjugado a qualquer veículo o qual pode proporcionar pelo menos um epítipo de células T auxiliar e pode ser toxóide do tétano, toxóide de difteria, Proteína D ou OMC de *N. meningitidis*.

Hib pode ser liofilizado e pode ser reconstituído extemporaneamente (por exemplo, com diluente, opcionalmente compreendendo outros componentes antigênicos das vacinas da invenção).

- 20 Em uma modalidade, Hib está presente em uma baixa dose (por exemplo, 1-6 µg, 2-4 µg ou em torno de ou exatamente 2,5 µg), conforme descrito no WO 02/00249.

- Em uma modalidade, os kits e vacina combinada da invenção compreendem Hib em uma dose de aproximadamente 10 µg. Em outra modalidade, os kits e vacina combinada da invenção podem compreender Hib em uma dose de aproximadamente 2,5 µg.

Antígenos de *Neisseria meningitidis* tipos A, B, C, W-135 ou Y

Os kits ou vacina combinada da invenção podem compreender um ou mais sacarídeos capsulares de uma bactéria selecionada do grupo consistindo de *N. meningitidis* tipo A, *N. meningitidis* tipo B, *N. meningitidis*

tipo C, *N. meningitidis* tipo Y e *N. meningitidis* tipo W-135 (aqui depois referido como W).

Em particular, os kits ou vacina combinada da invenção podem compreender conjugado de sacarídeo capsular de *Neisseria meningitidis* da cepa A, B, C, Y ou W ou das cepas A+B, A+C, A+Y, A+W, B+C, B+Y, B+W, C+Y, C+W ou Y+W ou das cepas A+B+C, A+B+Y, A+B+W, A+C+Y, A+C+W, B+C+Y, B+C+W ou C+Y+W ou das cepas A+B+C+Y, A+B+C+Y, A+C+Y+W, B+C+Y+W ou das cepas A+B+C+Y+W.

Em uma modalidade, o(s) componente(s) *Neisseria meningitidis* da invenção pode ser adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como hidróxido de alumínio. Em outra modalidade, o(s) componente(s) *Neisseria meningitidis* da invenção pode ser adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como fosfato de alumínio. Em uma outra modalidade, o(s) componente(s) *Neisseria meningitidis* pode ser adsorvido sobre uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Em uma modalidade, o(s) componente(s) *Neisseria meningitidis* pode estar não adsorvido sobre um adjuvante, por exemplo, um sal adjuvante de alumínio.

Antígenos de *Streptococcus pneumoniae*

Os kits ou vacina combinada da invenção podem compreender uma vacina que confere proteção contra infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Tal vacina é, comumente, compreendida de sacarídeos de 7, 8, 9, 10, 11, 13 ou mais sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* ou pode ser compreendida de sacarídeos de todos os 23 sorotipos conhecidos de *Streptococcus pneumoniae*. Exemplos de vacinas contra *Streptococcus pneumoniae* incluem Prevnar® e Synflorix®, as quais são descritas na seção definições.

Em uma modalidade, o(s) componente(s) *Streptococcus pneumoniae* da invenção pode ser adsorvido sobre um sal de alumínio, tal

como hidróxido de alumínio. Em outra modalidade, o(s) componente(s) *Streptococcus pneumoniae* da invenção pode ser adsorvido sobre um sal de alumínio, tal como fosfato de alumínio. Em uma outra modalidade, o(s) componente(s) *Streptococcus pneumoniae* pode ser adsorvido sobre uma
 5 mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Em uma modalidade, o(s) componente(s) *Streptococcus pneumoniae* pode estar não adsorvido sobre um adjuvante, por exemplo, um sal adjuvante de alumínio.

Conjugados

Conjugados de sacarídeo capsular bacteriano da invenção
 10 podem compreender qualquer peptídeo, polipeptídeo ou proteína veículo compreendendo pelo menos um epítipo de célula T auxiliar. A(s) proteína(s) veículo usada(s) pode(m) ser selecionada(s) do grupo consistindo de: toxóide do tétano, toxóide de difteria, CRM (incluindo CRM197, CRM176, CRM228, CRM45, CRM9, CRM45, CRM102, CRM103 e CRM 107), toxina
 15 recombinante de difteria (conforme descrito em qualquer um de US 4.709.017, WO 93/25210, WO 95/33481 ou WO 00/48638), pneumolisina (opcionalmente desintoxicada quimicamente ou um mutante desintoxicado) de *S. pneumoniae* (veja, por exemplo, WO 2004/081515 e referências mencionadas no mesmo), OMPC de *N. meningitidis* (EP 0372501) e proteína
 20 D (PD) de *H. influenzae* (EP 594610). Outros veículos podem incluir peptídeos sintéticos (EP 0378881; EP 0427347), proteínas de choque térmico (WO 93/17712; WO 94/03208), proteínas de pertussis (WO 98/58668; EP 0471177), citocinas (WO 91/01146), linfocinas (WO 91/01146), hormônios (WO 91/01146), fatores de crescimento (WO 91/01146), proteínas artificiais
 25 compreendendo múltiplos epítipos de células T CD4⁺ de vários antígenos derivados de patógeno (Falugi e colaboradores, 2001, Eur. J. Immunol. 31: 3816), proteína PspA da superfície pneumocócica (WO 02/091998), proteínas de captação de ferro (WO 01/72337), toxina A ou B de *C. difficile* (WO 00/61761), PhtD pneumocócica (WO 00/37105), PhtDE pneumocócica (por

exemplo, WO 01/98334 & WO 03/054007), PhtX, etc.

Sacarídeos podem estar todos sobre o mesmo veículo, particularmente todos os sacarídeos de um organismo em particular, por exemplo, sacarídeos de MenA, MenC, MenW e MenY podem ser todos conjugados a TT, DT ou CRM-197. Contudo, em virtude do efeito conhecido de supressão do veículo, pode ser vantajoso se, em cada uma das composições da invenção, os antígenos sacarídicos contidos na mesma ('n' antígenos) são conjugados a mais de um veículo. Assim, (n-1) dos sacarídeos poderiam ser trazidos (separadamente) sobre um tipo de veículo e 1 sobre um veículo diferente ou (n-2) sobre um e 2 sobre dois veículos diferentes, etc. Por exemplo, em uma vacina contendo 4 conjugados bacterianos de sacarídeo, 1, 2 ou todos os quatro poderiam ser conjugados a diferentes veículo. Proteína D, contudo, pode ser usada para vários (2, 3, 4 ou mais) sacarídeos em uma composição sem um efeito de supressão de veículo acentuado. Hib pode ser apresentado como um conjugado com TT, DT ou CRM197 e MenA, MenC, MenY e MenW podem ser conjugados com TT, DT, CRM197 ou PD. Vi pode estar presente como um conjugado de TT, DT ou CRM197. Proteína D é um veículo útil, uma vez que ela proporciona um outro antígeno o qual pode fornecer proteção contra *H. influenzae*. Em uma modalidade, todos os sacarídeos são conjugados à mesma proteína veículo.

Vi pode ser conjugado a uma proteína veículo, por exemplo, através de um método usando química de condensação com carbodiimida (por exemplo, EDAC) (dado que a subunidade repetida Vi compreende grupos ácido carboxílico). Isso poderia ser obtido através de (i) uma única reação com carbodiimida entre COOH de Vi e NH₂ da proteína ou (ii) uma reação dupla com carbodiimida, a qual pode ocorrer entre COOH de Vi e NH₂ de uma molécula ligante homobifuncional e COOH da proteína e NH₂ da molécula ligante homobifuncional ou entre COOH de Vi e NH₂ da molécula ligante heterobifuncional e NH₂ da proteína e COOH da molécula ligante

heterobifuncional.

Conjugação pode ser usada em conjunto com proteína(s) veículo livre(s). Em uma modalidade, quando uma determinada proteína veículo está presente na forma livre e conjugada em uma composição da invenção, a forma não conjugada é não mais do que 5% da quantidade total da proteína veículo na composição como um todo ou, em outra modalidade, está presente em menos de 2% em peso.

O sacarídeo pode ser ligado à proteína veículo através de qualquer método conhecido (por exemplo, Likhite, Patente U.S. 4.372.945 e Armor e colaboradores, Patente U.S. 4.474.757), com qualquer ligante adequado onde necessário.

O sacarídeo será, tipicamente, ativado ou funcionalizado antes de conjugação. Ativação pode envolver, por exemplo, agentes de cianilação, tais como CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-30 dimetilaminopiridínio) (WO 95/08348 & WO 96/29094). A reação de cianilação pode ser realizada sob condições relativamente suaves, o que evita a hidrólise dos sacarídeos sensíveis a agentes alcalinos. Essa síntese permite acoplamento direto a uma proteína veículo. Outras técnicas adequadas usam carbodiimidas, hidrazidas, ésteres ativos, norbornano, ácido p-nitrobenzóico, N-hidróxi-succinimida, S-NHS, EDC ou TSTU.

Ligações via um grupo ligante podem ser feitas usando qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos descritos na US 4.882.317 e US 4.695.624. Um tipo de ligação envolve aminação reductiva do sacarídeo, acoplamento do grupo amino resultante com uma extremidade de um grupo ligante de ácido adípico (EP 0477508, Porro e colaboradores, 1985, Mol. Immunol. 22: 907, EP 0208375) e, então, acoplamento de uma proteína à outra extremidade do grupo ligante de ácido adípico. Outras ligações incluem B-propionamido (WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever e colaboradores, 1979, Med. Microbiol. Immunol. 165:

171), haletos de haloacila (US 4.057.685), ligações glicosídicas (US 4.673.574; US 4.761.283; US 4.808.700), ácido 6-aminocapróico (US 4.459.286), ADH (US 4.965.338), porções C4 a C12 (US 4.663.160), etc. Como uma alternativa ao uso de um ligante, ligação direta pode ser usada.

- 5 Ligações diretas à proteína podem compreender oxidação do sacarídeo, seguido por aminação redutiva com a proteína, conforme descrito, por exemplo, na US 4.761.283 e US 4.356.170 ou uma reação direta com CDAP.

Após conjugação, sacarídeos livres e conjugados podem ser separados. Existem muitos métodos adequados para essa separação, incluindo

10 cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração, etc. (veja também Lei e colaboradores, 2000, Dev Biol. (Basel). 103: 259; WO 20 00/38711; US 6.146.902). Em uma modalidade, se uma vacina compreende um determinado sacarídeo nas formas livre e conjugada, a forma não conjugada é não mais do que 20% em peso da quantidade total desse

15 sacarídeo na composição como um todo (por exemplo, <15%, <10%, <5%, <2%, <1%).

Uma quantidade de sacarídeo a qual é capaz de conferir proteção a um hospedeiro (uma quantidade eficaz) pode ser determinada por aqueles habilitados na técnica. Em uma modalidade, cada dose compreenderá

20 0,1-100 µg de sacarídeo. Em outra modalidade, cada dose compreenderá 0,1-50 µg. Em ainda uma outra modalidade, cada dose compreenderá 0,1-10 µg, em ainda outra modalidade, cada dose compreenderá 1 a 5 µg.

Adjuvantes

Os kits e vacina combinada da invenção podem incluir um

25 excipiente farmacologicamente aceitável, tal como um adjuvante adequado. Adjuvantes adequados incluem um sal de alumínio, tal como hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, mas também podem ser um sal de cálcio, ferro ou zinco ou podem ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada ou açúcares acilados ou podem ser sacarídeos catiônica ou anionicamente

derivados, polifosfazenos, microesferas biodegradáveis, monofosforil lipídio A (MPL), derivados de lipídio A (por exemplo, de toxicidade reduzida), MPL 3-O-deacilada, quil A, Saponina, QS21, Adjuvante Incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), AS-2 (Smith-Kline Beecham, Filadélfia, PA), oligonucleotídeos CpG, bioadesivos e mucoadesivos, micropartículas, lipossomas, formulações de polioxietileno éter, formulações de polioxietileno éster, peptídeos de muramila ou compostos de imidazoquinolona (por exemplo, imiquamod e seus homólogos). Imunomoduladores humanos adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc), fator de estimulação de colônia de macrófago (M-CSF), fator de necrose de tumor (TNF), fator de estimulação de colônia de granulócito, macrófago (GM-CSF) podem também ser usados como adjuvantes.

Em uma modalidade da invenção, a composição adjuvante das formulações induz a uma resposta imune predominantemente do tipo TH1. Altos níveis de citocinas do tipo TH1 (por exemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tendem a favorecer a indução de respostas imunes célula-mediada ao antígeno administrado. Dentro de uma modalidade na qual uma resposta é predominantemente do tipo TH1, o nível de citocinas do tipo TH1 aumentará em um ponto maior do que o nível de citocinas do tipo TH2. Os níveis dessas citocinas podem ser prontamente avaliados usando ensaios padrões. Para uma revisão das famílias de citocinas veja Mosmann e Coffman, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7: 145.

Conseqüentemente, sistemas adjuvantes adequados os quais promovem predominantemente uma resposta TH1 incluem derivados de lipídio A (por exemplo, de toxicidade reduzida), Monofosforil lipídio A (MPL) ou um derivado do mesmo, particularmente monofosforil lipídio A 3-de-O-acilado (3D-MPL) e uma combinação de monofosforil lipídio A,

opcionalmente 3 monofosforil lipídio A 3-de-O-acilado junto com um sal de alumínio. Um sistema intensificado envolve a combinação de um monofosforil lipídio A e um derivado de saponina, particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL, conforme divulgado no WO 94/00153 ou
5 uma composição menos reatogênica, onde o QS21 é atenuado com colesterol, conforme divulgado no WO 96/33739. Uma formulação adjuvante particularmente potente envolvendo QS21, 3D-MPL e tocoferol em uma emulsão óleo em água é descrita no WO 95/17210. A vacina pode, adicionalmente, compreender uma saponina, a qual pode ser QS21. A
10 formulação também pode compreender uma emulsão óleo em água e tocoferol (WO 95/17210). Oligonucleotídeos contendo CpG não metilado (WO 96/02555) também são indutores preferenciais de uma resposta TH1 e são adequados para uso na presente invenção.

As vaccines da invenção podem também compreender
15 combinações de aspectos de um ou mais dos adjuvantes identificados acima.

Proporções de $\text{Al}(\text{OH})_3$ / AlPO_4 podem ser de 0/115, 23/92, 69/46, 46/69, 92/23 ou 115/0.

Alternativamente, determinados componentes das vacinas da invenção podem não ser expressamente adsorvidos sobre um adjuvante, em
20 particular sais de alumínio.

IPV pode ser adsorvido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$, DT pode ser adsorvido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 , TT pode ser adsorvido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 , Pw pode ser adsorvido sobre AlPO_4 , PRN pode ser adsorvido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$, HB pode ser adsorvido sobre AlPO_4 , Hib pode ser adsorvido sobre AlPO_4 ou
25 não adsorvido, Men ACWY pode ser adsorvido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlO_4 ou não adsorvido, MenB pode ser adsorvido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 ou não adsorvido, Vi pode ser adsorvido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 ou não adsorvido, HepA pode ser adsorvido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 .

Antígenos os quais são pré-adsorvidos sobre um sal de

alumínio podem ser pré-adsorvidos individualmente antes de mistura. Em outra modalidade, uma mistura de antígenos pode ser pré-adsorvida antes de mistura com outros adjuvantes. Em uma modalidade, IPV pode ser adsorvido separadamente ou como uma mistura de IPV tipos 1, 2 e 3.

5 O significado de "antígeno adsorvido" é tomada para significar mais de 30%, 40%, 50%>, 60%>, 70%, 80%, ou 90% adsorvido.

O significado dos termos "fosfato de alumínio" e "hidróxido de alumínio", conforme usado aqui, inclui todas as formas de hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio as quais são adequadas como adjuvantes de vacinas. Por exemplo, fosfato de alumínio pode ser um precipitado de fosfato de alumínio insolúvel (amorfo, semi-cristalino ou cristalino), o qual pode ser opcionalmente, mas não exclusivamente, preparado através de mistura de sais de alumínio solúveis e sais de ácido fosfórico. "Hidróxido de alumínio" pode ser um precipitado de hidróxido de alumínio insolúvel (amorfo, semi-cristalino ou cristalino), o qual pode ser opcionalmente, mas não exclusivamente, preparado através de neutralização de uma solução de sais de alumínio. Particularmente adequadas são as várias formas de géis de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio disponíveis de fontes comerciais, por exemplo, Alhydrogel (hidróxido de alumínio, suspensão a 3% em água) e Adju-for (fosfato de alumínio, suspensão a 2% em solução salina) fornecidos pela Superfos (Vedbeck, 2950 Dinamarca).

Componentes não imunológicos de vacinas da invenção

A vacina combinada da invenção compreenderá, tipicamente, além dos componentes antigênicos e adjuvantes mencionados acima, um ou mais "veículos ou excipientes farmacologicamente aceitáveis", os quais incluem qualquer excipiente que não induz, em si, à produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo que está recebendo a composição. Excipientes adequados são, tipicamente, grandes macromoléculas lentamente metabolizadas tais como proteínas, sacarídeos, ácidos polilácticos, ácidos

poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, sacarose (Paoletti e colaboradores, 2001, Vaccine, 19: 2118), trealose (WO 00/56365), lactose e agregados lipídicos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas). Tais veículos são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. As vacinas também podem conter diluentes, tais como água, solução salina, glicerol, etc. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes de umedecimento ou emulsificação, substâncias para tamponamento de pH e semelhantes podem estar presentes. Solução salina fisiológica tamponada com fosfato isenta de pirogênio, estéril é um veículo típico. Uma discussão completa de excipientes adequados está disponível na referência Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edição, ISBN: 0683306472.

As composições da invenção podem ser liofilizadas ou estar na forma aquosa, isto é, soluções ou suspensões. Formulações líquidas desse tipo permitem que as composições sejam administradas diretamente de sua forma embalada, sem a necessidade de reconstituição em um meio aquoso e, assim, são ideais para injeção. Composições podem ser apresentadas em frascos ou elas podem ser apresentadas em seringas enchidas prontas. As seringas podem ser fornecidas com ou sem agulhas. Uma seringa incluirá uma única dose da composição, enquanto que um frasco pode incluir uma única dose ou múltiplas doses (por exemplo, 2 doses).

Vacinas líquidas da invenção são também adequadas para reconstituição de outras vacinas a partir de uma forma liofilizada. Onde uma vacina tem de ser usada para tal reconstituição extemporânea, a invenção proporciona um kit o qual pode compreender dois frascos ou pode compreender uma seringa pronta enchida e um frasco, com os conteúdos da seringa sendo usados para reativar os conteúdos do frasco antes de injeção.

A vacina combinada da invenção pode ser embalada em uma forma de dose unitária ou em uma forma de múltiplas doses (por exemplo, 2

doses). Para formas com múltiplas doses, frascos são preferidos à seringas pré-enchidas. Volumes de dosagem eficazes podem ser rotineiramente estabelecidos, mas uma dose típica para seres humanos da composição para injeção tem um volume de 0,5 mL.

5 Em uma modalidade, a vacina combinada da invenção tem um pH de entre 6,0 e 8,0. Em outra modalidade, a vacina combinada tem um pH de entre 6,3 e 6,9, por exemplo, $6,6 \pm 0,2$. As vacinas podem ser tamponadas nesse pH. pH estável pode ser mantido através do uso de um tampão. Se uma composição compreende um sal de hidróxido de alumínio, um tampão de
10 histidina pode ser usado (WO03/009869). A composição deverá ser estéril e/ou isenta de pirogênio.

As composições da invenção podem ser isotônicas com relação a seres humanos.

 A vacina combinada da invenção pode incluir um
15 antimicrobiano, particularmente quando embalada em um formato com múltiplas doses. Tiomersal deverá ser evitado, uma vez que ele faz com que o componente IPV se precipite. Outros antimicrobianos podem ser usados, tais como 2-fenoxietanol. Qualquer conservante está, de preferência, presente em baixos níveis. Conservante pode ser adicionado exogenamente e/ou pode ser
20 um componente dos antígenos os quais são misturados para formar a composição (por exemplo, presente como um conservante em antígenos de pertussis).

 Em uma modalidade, a vacina combinada da invenção é isenta de tiomersal ou substancialmente isenta de tiomersal. Por isenta de tiomersal
25 ou substancialmente isenta de tiomersal entenda-se que não há tiomersal suficiente na formulação final para prejudicar negativamente a potência do componente IPV. Por exemplo, se tiomersal é usado durante o processo de purificação do antígeno na superfície de Hepatite B ou Pw, ele deverá ser substancialmente removido antes de mistura com IPV. O teor de tiomersal na

vacina final deverá ser menos de 0,025 µg/µg de proteína, 0,02 µg/µg de proteína, 0,1 µg/µg de proteína ou 0,001 µg/µg de proteína, por exemplo, 0 µg/µg de proteína. Em uma modalidade, tiomersal não é adicionado nem usado na purificação de qualquer componente. Veja, por exemplo, EP1307473 para processos com Hepatite B e veja acima para Pw, onde morte é obtida sem a presença de tiomersal.

As vacinas combinadas da invenção podem compreender um detergente, por exemplo, um Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Detergentes geralmente estão presentes em baixos níveis, por exemplo, < 0,01%.

A vacina combinada da invenção pode incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio) para proporcionar isotonicidade. A composição pode compreender cloreto de sódio. Em uma modalidade, a concentração de cloreto de sódio na composição da invenção está na faixa de e 0,1 a 100 mg/mL (por exemplo, 1-50 mg/mL, 2-20 mg/mL, 5-15 mg/mL) e, em uma outra modalidade, a concentração de cloreto de sódio é de 10 ± 2 mg/mL de NaCl, por exemplo, cerca de 9 mg/mL.

A vacina combinada da invenção geralmente incluirá um tampão. Um tampão de fosfato ou histidina é típico.

A vacina combinada da invenção pode incluir íons de fosfato livres em solução (por exemplo, através do uso de um tampão de fosfato) de modo a favorecer a não-adsorção de antígenos. A concentração de íons de fosfato livre na composição da invenção está, em uma modalidade, entre 0,1 e 10,0 mM ou, em outra modalidade, entre 1 e 5 mM ou, em ainda outra modalidade, cerca de 2,5 mM.

Propriedades da vacina combinada da invenção

Em uma modalidade, a vacina combinada da invenção é formulada como uma vacina para administração *in vivo* ao hospedeiro, de uma forma tal que os componentes individuais da composição são formulados

para que a imunogenicidade dos componentes individuais não seja substancialmente prejudicada por outros componentes individuais da composição. Por não seja substancialmente prejudicada entenda-se que, quando de imunização, uma titulação de anticorpo contra cada componente é obtida, a qual é mais de 60%>, 70%>, 80%> ou 90%> ou 95-100%> do que a titulação obtida quando o antígeno é administrado isoladamente. Assim, em modalidades preferidas, nenhum efeito prejudicial (significativo) ocorre aos outros componentes (em termos de eficácia protetora) na combinação quando comparado à sua administração isoladamente.

10 **Formulações de vacina**

Em uma modalidade, a vacina combinada da invenção é formulada como uma vacina para administração *in vivo* ao hospedeiro, de modo que ela confere uma titulação de anticorpos superior ao critério para soroproteção para cada componente antigênico para um percentual aceitável de seres humanos. Isso é um teste importante na avaliação de eficácia de uma vacina por toda a população. Antígenos com titulações de anticorpo associadas acima das quais um hospedeiro é considerado como soroconvertido contra o antígeno são bem conhecidas e tais titulações são publicadas por organizações, tal como OMS. Em uma modalidade, mais de 80% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos são soroconvertidos, em outra modalidade, mais de 90% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos são soroconvertidos, em uma outra modalidade, mais de 93% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos são soroconvertidos e, em ainda outra modalidade, 96-100% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos são soroconvertidos.

A quantidade de antígeno em cada dose de vacina é selecionada como uma quantidade a qual induz a uma resposta imunoprotetora sem efeitos colaterais adversos significativos em vacinas típicas. Tal quantidade variará, dependendo de quais imunogênios específicos

são empregados. Geralmente, espera-se que cada dose compreenda 1-1000 μg de imunogênio total ou 1-100 μg ou 1-40 μg ou 1-5 μg . Uma quantidade ótima para uma vacina em particular pode ser determinada através de estudos envolvendo observação das titulações de anticorpo e outras respostas em indivíduos. Um curso de vacinação primária pode incluir 2-3 doses de vacina, fornecidas com um a dois meses de distância, por exemplo, seguindo as recomendações da OMS para imunização DTP.

Acondicionamento das vacinas da invenção

A vacina combinada da invenção pode ser embalada em vários tipos de recipientes, por exemplo, em frascos, seringas, etc. Um frasco com múltiplas doses compreenderá, tipicamente, um orifício plástico re-vedável através do qual uma agulha estéril pode ser inserida para remover uma dose de vacina, o qual é novamente fechado após a agulha ter sido removida.

A vacina pode ser fornecida em vários recipientes (por exemplo, 2 ou 3). Os conteúdos dos recipientes podem ser misturados extemporaneamente antes de administração a um hospedeiro em uma única injeção ou podem ser administrados concomitantemente em diferentes locais. A dose da vacina será, tipicamente, de 0,5 mL.

Os inventores descobriram, surpreendentemente, que um kit proporcionado das formas acima apresenta, vantajosamente, os vários antígenos ao sistema imune de um hospedeiro de uma maneira ótima. O kit proporciona ao médico um método ótimo de imunização de um hospedeiro com uma ou mais das seguintes vantagens: eficácia protetora para todos os antígenos, reatogenicidade mínima, interferência mínima de supressão pelo veículo, interferência mínima pelo adjuvante/antígeno ou interferência mínima por antígeno/antígeno, de uma forma tal que esses objetivos podem ser obtidos com o número mínimo de administrações (duas), opcionalmente ocorrendo na mesma visita ao médico.

Em uma modalidade, a vacina combinada dos primeiro e

segundo recipientes são administradas concomitantemente em diferentes locais (conforme descrito abaixo sob "administração de vacinas da invenção") e, em uma modalidade alternativa, os inventores consideram que os conteúdos dos primeiro e segundo recipientes podem ser misturados (opcionalmente extemporaneamente) antes de administração como uma vacina única.

Preparo das vacinas da invenção

A presente invenção também proporciona um método para produção de uma formulação de vacina compreendendo a etapa de mistura dos componentes da vacina junto com um excipiente farmacologicamente aceitável.

Em uma modalidade da presente invenção, é proporcionada uma vacina conforme descrito aqui para uso em um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças causadas por infecção por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*.

Adicionalmente, um método de imunização de um ser humano contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*, método o qual compreende administração, ao hospedeiro, de uma dose imunoprotetora da vacina da invenção, também é proporcionado.

A quantidade de antígeno em cada dose de vacina é selecionada como uma quantidade a qual induz a uma resposta imunoprotetora sem efeitos colaterais adversos significativos em vacinas típicas. Tal quantidade variará, dependendo de qual imunogênio específico é empregado e como ele é apresentado. Em uma modalidade, cada dose compreenderá 0,1-100 µg de sacarídeo, em outra modalidade, cada dose compreenderá 0,1-50 µg, em uma outra modalidade, cada dose compreenderá

0,1-10 μg , em ainda uma outra modalidade, cada dose compreenderá 1 a 5 μg de sacarídeo.

Em uma modalidade, o teor de antígenos de proteína na vacina estará na faixa de 1-100 μg , em outra modalidade, o teor de antígenos de proteína nas vacinas estará na faixa de 5-50 μg , em uma outra modalidade, o teor dos antígenos de proteína nas vacinas estará na faixa de 5-25 μg .

O preparo da vacina é geralmente descrito em Vaccine Design ["The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York]. Encapsulação dentro de lipossomas é descrita por Fullerton, Patente US 4.235.877. A conjugação de proteínas à macromoléculas é divulgada, por exemplo, por Likhite, Patente US 4.372.945 e por Armor e colaboradores, Patente US 4.474.757. O uso de Quil A é divulgado por Dalsgaard e colaboradores, 1977, Acta Vet Scand. 18: 349. 3D-MPL está disponível da Ribi immunochem, EUA e é divulgado no Pedido de Patente Britânica No. 2220211 e Patente US 4.912.094. QS21 é divulgado na Patente US 5.057.540.

Em uma modalidade, a quantidade de conjugado por dose de 0,5 mL de vacina volumétrica é de menos de 10 μg (de sacarídeo no conjugado), em outra modalidade, a quantidade de conjugado é 1-7, em outra modalidade, a quantidade de conjugado é 2-6 μg ou, em uma outra modalidade, cerca de 2,5, 3, 4 ou 5 μg .

Será apreciado que determinados componentes, por exemplo, componentes DTPw, podem ser combinados separadamente antes de adição ao HBsAg adsorvido ou outros componentes.

Um método para fazer a vacina combinada da invenção é também proporcionado compreendendo a etapa de mistura dos antígenos com um excipiente farmacologicamente aceitável.

Administração das vacinas da invenção

A invenção proporciona um método para elevação de uma

resposta imune em um mamífero compreendendo a etapa de administração de uma quantidade eficaz de uma vacina d antígeno. As vacinas podem ser administrada profilaticamente (isto é, para prevenir infecção) ou terapeuticamente (isto é, para tratar uma doença após infecção). A resposta imune é, de preferência, protetora e, de preferência, envolve anticorpos. O método pode estimular uma resposta de reforço.

Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber uma ou várias imunizações de reforço adequadamente espaçadas. Tratamento de dosagem pode ser um esquema com uma única dose ou um esquema com múltiplas doses. Múltiplas doses podem ser usadas em um esquema de imunização primária e/ou em um esquema de imunização de reforço. Um esquema de dose primária, o qual pode ser no primeiro ano de vida, pode ser seguido por um esquema de dose de reforço. O momento adequado entre as doses de iniciação (por exemplo, entre 4-16 semanas) e entre iniciação e reforço pode ser rotineiramente determinado.

Em uma modalidade, o mamífero é um ser humano. Onde a vacina é para uso profilático, o ser humano é, de preferência, uma criança (por exemplo, um bebê) ou um adolescente; onde a vacina é para uso terapêutico, o ser humano é, de preferência, um adulto. Uma vacina destinada à crianças pode também ser administrada a adultos, por exemplo, para avaliar a segurança, dosagem, imunogenicidade, etc.

Os preparados de vacina da presente invenção podem ser usados para proteger ou tratar um mamífero suscetível à infecção por meio de administração da referida vacina diretamente a um paciente. Distribuição direta pode ser realizada através de injeção parenteral (intramuscularmente, intraperitonealmente, intradermicamente, subcutaneamente, intravenosamente ou ao espaço intersticial de um tecido); ou através de administração retal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar ou outra mucosal. Em uma modalidade, a administração é através de injeção

intramuscular à coxa ou parte superior do braço. A injeção pode ser via uma agulha (por exemplo, uma agulha hipodérmica), mas injeção sem agulha pode, alternativamente, ser usada. Uma dose intramuscular típica é 0,5 mL.

Infecções bacterianas afetam várias áreas do corpo e, assim, as composições da invenção podem ser preparadas de várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injetáveis, seja como soluções ou suspensões líquidas. A composição pode ser preparada para administração pulmonar, por exemplo, como um inalador, usando um pó fino ou spray. A composição pode ser preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, aural ou ocular, por exemplo, como um spray, gotas, gel ou pó (por exemplo, veja Almeida & Alpar, 1996, J Drug Targeting, 3: 455; Bergquist e colaboradores, 1998, APMIS, 106: 800). Administração intranasal com sucesso de vacinas DTP foi reportada (Ryan e colaboradores, 1999, Infect. Immun., 67: 6270; Nagai e colaboradores, 2001, Vaccine, 19: 4824).

Em uma modalidade, as vacinas dos primeiro e segundo (e terceiro onde aplicável) recipientes são administradas concomitantemente em diferentes locais e, em uma modalidade alternativa, os inventores consideram que os conteúdos dos primeiro e segundo recipientes podem ser misturados (opcionalmente extemporaneamente) antes de administração como uma única vacina.

A invenção pode ser usada para estimular imunidade sistêmica e/ou mucosal.

Uma forma de verificar a eficácia de tratamento terapêutico envolve monitoramento de infecção bacteriana após administração da composição da invenção. Uma forma de verificar a eficácia de tratamento profilático envolve monitoramento de respostas imunes contra os antígenos após administração da composição. A imunogenicidade das composições da invenção pode ser determinada através de administração das mesmas a

indivíduos de teste (por exemplo, crianças de 12-16 meses de idade ou modelos animais - WO 01/30390) e, então, determinação de parâmetros imunológicos padrões. Essas respostas imunes geralmente serão determinadas em torno de 4 meses após administração da composição e comparadas com valores determinados antes de administração da composição. Ao invés de avaliar a eficácia protetora real em pacientes, modelos animais e *in vitro* padrões e correlações da proteção para avaliação da eficácia de vacinas DTP são bem conhecidas.

Todas as referências e publicações citadas são incorporadas por referência aqui.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Sumário

A vacinação de bebês com combinações de DTPa-Hib (com ou sem HBV e IPV) geralmente leva a um alto percentual de bebês com concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ anti-PRP, um critério que está relacionado a um alto nível de proteção contra doença por Hib após imunização com conjugado. Recentemente, foi observado que a vacinação com DTPa3-Hib estava associada atipicamente a baixos níveis de anticorpo no Reino Unido e esses foram associados a um surto de casos de Hib. Embora acredite-se que a ausência de um reforço na infância seja um fator chave que explica o nível diminuído de doença por Hib, é sugerido aqui que a co-administração de conjugado MenC-CRM197 que coincidiu com a introdução de DTPa3-Hib no Reino Unido provavelmente exerceu um papel nas respostas imunes anti-PRP diminuídas. Combinação de vacinas DTPa3 com IPV parece intensificar a resposta a alguns antígenos, tais como hepatite B e Hib. Tais combinações de DTPa(HBV)IPV-Hib parecem não sofrer do impacto de co-administração de CRM197 sobre a resposta ao Hib. Essas observações fundamentam a necessidade de avaliar cuidadosamente as futuras

vacinas conjugadas pediátricas quanto a possíveis efeitos de interferência quando co-administradas com antígenos DTPa, HBV, IPV e Hib, com atenção particular à hepatite B e Hib-TT.

Palavras chave: *Haemophilus influenzae* tipo b, Hib, vacina, imunidade, interferência, vacina conjugada, reforço, vacina contra pólio inativada (IPV).

Problemas chave

- Vacinas combinadas contra Hib baseadas em DTPa são imunogênicas e eficazes na prevenção de doença contra Hib. Proteção está associada a 1) a capacidade de induzir a uma alta proporção de indivíduos que atingem o nível de anticorpo protetor de 0,15 µg após imunização primária; 2) aumentar a titulação e qualidade dos anticorpos após o reforço na infância; e 3) efeitos de imunidade em massa observados principalmente após o reforço na infância. Nenhuma diferença entre as várias combinações de Hib-TT baseadas em DTPa comercialmente disponíveis foi observada em termos da proporção de indivíduos que atingiram o corte de 0,15 µg após vacinação primária.

- Durante o final de 1990, os efeitos de uma campanha inicial no Reino Unido e a imunidade da população ao Hib declinou. A imunidade não foi compensada por uma dose de reforço no segundo ano de vida e falhas da vacina conjugada de Hib aumentaram em 1999. Acredita-se que a ausência de um reforço seja, em geral, um fator chave que explica o controle de Hib diminuído no Reino Unido. Durante o período de controle diminuído de Hib, o Reino Unido trocou de DTPw-Hib para DTPa3-Hib e imunização pediátrica com MenC-CRM197 foi introduzida aproximadamente ao mesmo tempo.

- Experimentos clínicos de vacinas combinadas contra Hib baseadas em DTPa co-administrada com vacinas contendo CRM197 indicam efeitos consistentes com a interferência de vizinhança sobre a resposta de anticorpo ao PRP. Em uma situação de declínio de imunidade da população e

respostas de linha de base da população consistentemente na menor extremidade do espectro de anticorpos anti-PRP observados, as concentrações de anticorpo anormalmente baixas induzidas por DTPa3-Hib co-administrada com MenC-CRM 197 foram insuficientes para proporcionar proteção adequada a algumas crianças vacinadas, provavelmente contribuindo para o aumento no número de falhas da vacina contra Hib observadas quando DTPa3-Hib estava em uso.

- Experimentos clínicos com vacina combinada DTPa3(HBV)IPV-Hib co-administrada com vacinas conjugadas MenC-CRM 197 ou 7vPCV-CRM197 não revelam a interferência de vizinhança de co-administração, o que sugere um efeito protetor, mais provavelmente pelo IPV. Os poucos estudos cabeça-a-cabeça que compararam uma vacina combinada contendo Hib com e sem IPV demonstraram maiores níveis de anticorpo anti-PRP e anti-HBs quando IPV foi parte da combinação. Adicionalmente, descobriu-se que a combinação DTPa3-Hib, mas não a combinação DTPa3-HBV-IPV-Hib, induziu a anticorpos anti-PRP com avidez diminuída quando comparado com o conjugado de Hib fornecido separadamente. Isso pode explicar a suscetibilidade à interferência de vizinhança de DTPa3-Hib ao CRM197-conjugado, enquanto que DTPa3(HBV)IPV-Hib não é ou é menos suscetível à mesma.

- Uma vez que números crescentes de vacinas conjugadas, tais como Hib-MenCY-TT, ACWY-DT, ACWY-CRM197, ACWY-TT, 10vPCV-Proteína D e 13vPCV-CRM197, estão sendo avaliadas para serem combinadas com programas de vacinação com DTPa, HBV, IPV, Hib em bebês, é essencial que experimentos apropriadamente controlados sejam conduzidos para avaliar as respostas específicas antes de implementação em um ambiente de saúde pública.

Base: *Haemophilus influenzae* tipo b

A cada ano, estima-se que *Haemophilus influenzae* tipo b

(Hib) cause três milhões de enfermidades graves e resulte em entre 400.000 e 700.000 mortes no mundo todo [1]. Antes da disponibilidade de vacinas conjugadas eficazes, a incidência de meningite por Hib em crianças de 0 a 4 anos de idade oscilava de 32 a 60 por 100.000, com a maior incidência e taxas de casos fatais (até 30%) observadas em países em desenvolvimento [2]. Após a introdução de vacinação de bebês com vacinas conjugadas de Hib, muitos países registram agora baixas taxas de incidência de meningite de <2 por 100.000.

Hib é trazido assintomaticamente no trato respiratório superior em até 15 % dos indivíduos [3], mas apenas uma minoria de indivíduos colonizados desenvolve doença invasiva grave. A doença resulta de invasão pela bactéria na corrente sanguínea via o epitélio respiratório, com disseminação para o sistema nervoso central e outros locais. meningite e septicemia são as síndromes clínicas mais freqüentemente observadas e epiglotite, artrite, celulite e osteomielite também podem ocorrer.

Acredita-se que o polissacarídeo capsular (CP) seja o determinante de virulência mais importante do Hib em virtude de sua interação com complemento que permite superar o sistema de defesa antibacteriano [4]. A capacidade do hospedeiro de produzir anticorpos contra CP exerce um papel central na defesa contra a maioria das bactérias encapsuladas [5]. Contudo, as características da resposta imune ao polissacarídeo (PS) são um desenvolvimento tardio em ontogene. Polissacarídeos são, em geral, pobremente imunogênicos em bebês até a idade de 18-21 meses, embora alguns polissacarídeos sejam capazes de induzir à respostas imunes mais cedo. Acredita-se que a zona marginal do baço, a qual está faltando em neonatos humanos, exerce um papel importante no início e desenvolvimento de uma resposta de anticorpo T-independente ao polissacarídeo [6]. Células dendríticas da zona marginal apresentam antígenos de CP à células B da zona marginal não em re-circulação maduras [7]. A zona marginal do baço contém

células B relativamente maduras (positivas para receptor de IL-2), IgM, IgD na superfície e, mais importante, uma alta densidade de antígeno CD21, o receptor para o componente complemento C3d que media ativação de células B [8]. Isso corresponde às observações de que a imunogenicidade de bactérias encapsuladas está relacionada às propriedades de ativação de complemento de sua cápsula de PS, dividindo os produtos de C3 em C3b e C3d e influenciando a produção de anticorpos ao PS através de ativação de células B [9, 10]. Em geral, acredita-se que iniciação natural através de transmissão de bactérias específicas ou reativas também é um componente essencial da capacidade de resposta a polissacarídeos planos. Uma vez que os bebês responderam ao iniciação natural, imunização com polissacarídeos planos se torna possível.

Vacinas de polissacarídeo de Hib

O desenvolvimento de vacinas de CP de Hib começou durante a década de 1970 e eficácia idade-dependente durante doença invasiva foi demonstrada, sem nenhuma proteção observada em crianças vacinadas em torno de 18 meses de idade [11]. Bebês raramente respondem à vacina de CP de Hib, com baixos níveis de anticorpo e nenhuma evidência de desenvolvimento de memória imunológica [12]. Respostas imunes melhoram após 18 meses de idade, embora crianças com idade de 18-23 meses não respondam bem, assim como aquelas >2 anos de idade. Os níveis de anticorpo em adultos após vacinação são obtidos em torno da idade de aproximadamente 6 anos.

A limitação primária de vacinas de CP de Hib é sua incapacidade de induzir a uma resposta imune em bebês <2 anos de idade, a população na qual doença invasiva por Hib ocorre mais frequentemente. Assim como outras vacinas PS, vacinas de CP de Hib não proporcionam proteção a longo prazo, redução na transmissão nasofaríngea do organismo nem imunidade em massa. Para superar as deficiências da vacina de CP de

Hib, vacinas aprimoradas foram desenvolvidas através de conjugação química de poli-ribose-ribitol-fosfato (PRP) de CP de Hib à proteínas veículo células T-dependentes.

Vacinas conjugadas de Hib

5 O acoplamento de PRP a uma proteína veículo permitiu que células B estimuladas por PRP se tornem ativadas por células T auxiliares, fazendo com que respostas de anticorpo precoces na infância sejam maturadas com o tempo, com indução paralela de memória de células B ao PRP. Quatro tipos de vacinas conjugadas de Hib com diferentes proteínas veículo foram, desde então, licenciadas: PRP conjugado a toxóide de difteria (PRP-D), PRP conjugado a toxóide do tétano (PRP-T), oligossacarídeo de Hib conjugado a CRM197 (uma toxina de difteria não tóxica com mutação [a vacina também foi denominada HbOC]) e PRP conjugado ao complexo de proteína da membrana externa de *Neisseria meningitidis* (PRP-OMP). Assim como
10 diferem quanto à natureza da proteína, essas vacinas diferem quanto ao comprimento do polissacarídeo, o método de ligação de sacarídeo-proteína e a proporção de sacarídeo-proteína.

 As respostas imunes à vacinas conjugadas de Hib diferem profundamente daquelas ao CP nativo. Todas as vacinas conjugadas são
20 altamente imunogênicas em adultos e foi provado serem mais imunogênicas do que CP Hib plano em crianças jovens [14, 15, 16,17, 18, 19]. Re-vacinação com vacina de conjugado ou CP nativo induz à respostas de reforço [20] que são independentes do nível de anticorpo no momento de re-vacinação [15, 18, 19].

25 A resposta de anticorpo e distribuição de subclasse de anticorpo em adultos não difere após imunização com CP de Hib ou conjugado de CP de Hib [21]. Crianças <2 anos de idade mostram predominantemente uma resposta de IgG1 à vacina conjugada de Hib e CP de Hib, enquanto que anticorpos IgG1 e IgG2 são induzidos em adultos [21].

Essa diferença de idade é em virtude de maturação retardada da resposta de anticorpo de subclasse IgG2 que atinge níveis em adultos apenas a 8-12 anos de idade [22]. As grandes diferenças observadas em adultos com relação à distribuição de respostas anti-PRP de IgG1 e IgG2 se correlacionam com o nível de anticorpos naturais pré-existent, sugerindo que iniciação natural favorece uma resposta posterior de IgG2 [23].

Comparado com a vacinação com CP de Hib, a vacinação de bebês com vacina conjugada de Hib aumenta a quantidade de anticorpos IgG produzidos e aumenta a proporção de IgG para IgM quando de vacinação repetida. A predominância da subclasse IgG1 aumenta ainda quando de imunização de reforço [24].

Vacinas conjugadas de Hib licenciadas

Embora todas as vacinas conjugadas sejam imunogênicas em crianças jovens, diferenças podem ser observadas entre as vacinas conjugadas de Hib licenciadas em termos de nível de anticorpo obtido, expressão de idiotipo, momento de resposta de anticorpo estimulada em bebês e taxa de maturação de avididade com o tempo [25].

Estudos clínicos de vacinas conjugadas de Hib mostram variação substancial entre vacinas em termos da magnitude da concentração média geométrica de anticorpo pós-vacinação (GMC) obtida [26], com a menor GMC (0,28-0,73 µg/ml) após três vacinações com PRP-D em bebês de 2 a 6 meses de idade [13, 27, 28]. A manutenção de níveis de anticorpos protetores também varia, com um estudo mostrando níveis de anticorpo persistentes maiores após PRP-T comparado com PRP-OMP [29]. PRP-OMP é caracterizada por maiores respostas de anticorpo após a primeira imunização primária, comparado com outras vacinas de conjugado, embora as respostas pós-primária e de reforço seja menos pronunciadas, comparado com PRP-T e Hib-CRM197 [28]. Essa resposta precoce sugere uma propriedade mitogênica de células B intrínseca do conjugado PRP-OMP, além de capacidade de

ativação de células T auxiliares [20].

Em um estudo de três vacinas conjugadas de Hib, Hib-CRM197 gerou os maiores níveis de IgG1 e proporção de IgG1/IgG2 comparado com PRP-D e PRP-OMP [30], refletindo os maiores níveis totais de anticorpo induzidos por Hib-CRM197 [31]. Em termos de atividade funcional, os anticorpos anti-PRP induzidos por vacinas de conjugado de Hib, PRP-TT induz a uma qualidade aumentada de anticorpos anti-PRP comparado com PRP-OMP [32, 33]. Todas as quatro vacinas de conjugado de Hib foram avaliadas em estudos de eficácia protetora (Tabela 1), a despeito de diferenças muito acentuadas quanto a seu perfil de imunogenicidade, todas demonstraram eficácia contra doença invasiva por Hib quando administradas em pelo menos duas doses a bebês, com a exceção de PRP-D. Embora altamente eficaz na Finlândia, PRP-D falhou em proteger crianças nativas do Alasca [34], até grande ponto como um resultado da epidemiologia única da doença por Hib nessa população, caracterizada por altas taxas de doença que ocorrem muito cedo na vida. Em virtude da resposta de anticorpo alta e precoce que é obtida após uma única dose de PRP-OMP, PRP-OMP tem, desde então, sido usada com sucesso no Alasca, bem como outras populações principais indígenas com epidemiologia similar, tais como Aborígenes Australianos.

Transmissão e imunidade em massa

Nos primeiros anos após introdução de vacinação de rotina com conjugado de Hib, uma diminuição na carga da doença foi observada, a qual era desproporcional à população que foi vacinada. Após a introdução de PRP-D nos EU para crianças > 18 meses de idade, a incidência de doença por Hib declinou em crianças < 18 meses que não tinham sido incluídas na vacinação de rotina [39]. Esses dados sugerem que a vacinação com conjugado de Hib não apenas confere proteção a bebês e crianças mais velhas vacinadas, mas também diminui a transmissão de Hib para bebês suscetíveis

não imunizados [40, 41].

Crianças imunizadas com vacinas conjugadas de Hib, mas não vacina de CP de Hib, estão em menor risco de colonização nasofaríngeal por Hib do que crianças não vacinadas [40, 41, 42, 43]. O mecanismo responsável é sugerido como sendo a presença de anticorpos de CP de Hib na mucosa nasofaríngeal [44]. Uma maior concentração de anticorpo anti-PRP no soro (3-7 $\mu\text{g/ml}$) parece ser necessária para prevenir a colonização do que prevenir doença invasiva [20], o que sugere que a maioria da imunidade em massa é induzida por reforço quando bebês. Em adultos vacinados, anticorpos IgG anti-PRP detectados em secreções nasofaríngeais e saliva provavelmente são derivados de altas concentrações de anticorpo [44]. Menores concentrações de anticorpo em bebês vacinados 2-4 vezes, mas sem um reforço, foram associadas à prevenção menos completa de transmissão [42, 45, 46]. Uma vez que anticorpos serão altos apenas imediatamente após imunização, a memória imunológica pode também exercer um papel na prevenção ou redução de colonização.

Correlações sorológicas de proteção

Estudos de imunização passiva estimaram que as concentrações de anticorpo anti-CP de Hib estão entre 0,05 e 0,15 $\mu\text{g/ml}$ [5]. Análise de experimentos de eficácia usando vacinas de CP de Hib demonstraram que 90% dos bebês imunizados a 18-23 meses de idade ainda tinham anticorpos de CP de Hib $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ um ano e meio após vacinação, o que se correlacionou com a eficácia protetora observada [11, 12]. Esses estudos estabeleceram uma concentração de anticorpo necessária de 0,05-0,15 $\mu\text{g/ml}$ no momento de exposição à colonização para prevenir doença [47, 48] o qual levou ao procedimento padrão para expressar soroproteção contra CP de Hib como o percentual $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$. No plano Finnish de experimentos de eficácia contra PRP, o percentual de crianças >18 meses de idade com níveis de anticorpo pós-imunização $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ três semanas após imunização refletiu

a eficácia observada nesse grupo de idade. Uma vez que as concentrações de anticorpo variam após imunização, uma concentração pós-vacinação de 1 µg/ml foi estimada como sendo necessária para assegurar uma concentração mínima de pelo menos 0,1 µg/ml durante o ano subsequente.

5 Níveis de anticorpo anti-PRP protetores a longo prazo putativos derivados de estudos com PS de Hib podem super-estimar a concentração de anticorpo anti-PRP requeridos para proteção a longo prazo após vacinação com conjugado de Hib em virtude de atividade funcional aprimorada (isotipo e maturação de avides) de anticorpos quando de
10 vacinação repetida e geração de células B de memória [47, 49]. Observações a partir de experimentos no campo com vacinas conjugadas de Hib sustentam essa hipótese, embora a concentração exata de anticorpo no soro suficiente para conferir proteção contra doença por Hib seja difícil de definir, uma vez que a atividade funcional de anticorpos anti-CP de Hib é dependente da
15 concentração, isotipo de Ig e avides.

 A Tabela 1 resume os experimentos de eficácia, onde dados sobre a eficácia protetora, bem como imunogenicidade, estão disponíveis. Em muitos estudos, a proporção de crianças excedendo ao limiar protetor putativo de 1 µg/ml após a série de imunizações primárias sub-estimou
20 substancialmente a eficácia protetora demonstrada. Em contraste, a proporção de bebês que obtiveram concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 0,15$ µg/ml refletiu mais intimamente as estimativas observadas de eficácia da vacina [13, 49, 50]. Uma vez que a qualidade de anticorpo anti-PRP aumenta com o tempo após vacinação primária [51], o nível protetor de anticorpo maturado
25 pode, na verdade, ser menor do que 0,15 µg/ml: na faixa de 0,05 µg/ml [20, 52].

 Eskola e colaboradores (1990) [35] postularam que qualquer nível mensurável de anticorpo na presença de memória é suficiente para proteção. Na Finlândia, a eficácia protetora de 90% se aproximou mais da

proporção de indivíduos com concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ (85%) comparado com $\geq 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ (70%>).

Em geral, embora 5%> a 68 %> das crianças vacinadas com vacinas conjugadas de Hib não tenham obtido níveis de anticorpo ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ após imunização primária (Tabela 1), quase todas elas estão protegidas com respostas de anticorpo a CP de Hib, evidenciado pela presença de anticorpo detectável após vacinação e estão protegidas contra doença por Hib.

Atividade funcional de anticorpos anti-PRP

Anticorpos anti-PRP gerados pelas vacinas conjugadas de Hib são eficazes *in vitro* em opsonofagocitose e testes bactericidas e em imunização passiva *in vivo* em ratos bebês após um estímulo com Hib [52, 53]. A atividade de complemento de frações de IgG1 e IgG2 em adultos saudáveis varia quando exposta ao Hib, embora IgG1 seja mais ativa na maioria [54]. Outros estudos demonstraram que uma maior dose de anticorpo anti-PRP IgG2 de baixa avidéz é requerida para conferir proteção em um modelo com ratos bebês comparado com IgG1 de maior avidéz [33, 55].

A avidéz dos anticorpos anti-PRP aumenta da pós-primária para pré-reforço após imunização com conjugado [51, 52], mas não aumenta muito mais após uma dose de reforço no segundo ano de vida. A avidéz aumentada e memória induzida provavelmente explica porque a proteção contra doença por Hib permanece alta mesmo quando números consideráveis de crianças demonstram concentrações de anticorpo anti-PRP $< 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ em períodos pré-reforço. O aumento na avidéz reflete o processo de hipermutação somática de genes de Ig e a subsequente seleção das células B de alta afinidade resultantes que ocorrem no centro germinal após uma resposta células T-dependente [56]. Em alguns estudos, uma relação entre avidéz aumentada de anticorpo e função de anticorpo mais eficaz foi mostrada [32, 57]. A avidéz de anticorpo parece se correlacionar com a atividade bacteriana [32] e foi sugerida como um marcador substituto para memória

imunológica [56].

Embora a vacina conjugada PRP-OMP induza a um repertório de anticorpo diferentes com menor avidéz e atividade anti-bactericida comparável à outras vacinas [32], foi provado que a PRP-OMP é eficaz. Isso indica que um nível limiar com relação à atividade anti-bacteriana de anticorpos CP ao Hib existe. A importância relativa da atividade bactericida direta ou opsonofagocítica no mecanismo de defesa anti-Hib em seres humanos ainda é questionável. Apenas muito ocasionalmente a doença por Hib é encontrada em indivíduos com deficiência de componente complemento terminal, embora essa deficiência seja comumente associada à doença meningocócica [58]. Estudos de meningite por Hib em camundongos C5-deficientes demonstrou uma capacidade normal de faga de Hib enquanto que, no caso de depleção de C3, uma faga deficiente foi observada, indicando que a opsonofagocitose é criticamente importante. Virtualmente todos os adultos normais parecem possuir capacidade opsonofagocítica, sendo dependente da anticorpos a CP de Hib, enquanto que cerca de metade dos adultos demonstram atividade bactericida [59].

Vacina combinada contra Hib baseada em DTPa

Após a introdução com sucesso de vacinas de conjugado de Hib licenciadas que resultou em diminuições rápidas e impressionantes da transmissão de Hib e doença invasiva por Hib, vacinas combinadas contra Hib baseadas em DTPw e DTPa foram produzidas e introduzidas em um grande número de países. A mistura de vacinas baseadas em DTPa com PRP-T ou Hib-CRM197 resulta em um menor percentual de bebês com concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ e menores GMCs de anticorpo do que quando as vacinas são administradas em locais distintos [60, 61, 62]. Contudo, de modo importante, a proporção de bebês que obtiveram concentrações de pico de anticorpo anti-PRP $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ não é diferente.

Quatro vacinas combinadas contra Hib baseadas em DTPa

foram desenvolvidas: uma usando Hib-CRM197 (não mais disponível) e três baseadas em Hib-TT, combinado com DTPa2 (Pa com 2-componente [toxóide de pertussis - PT + hemaglutinina filamentosa - FHA]), DTPa3 (Pa com 3-componentes [PT, FHA + pertactina - PRN]) ou DTPa5 (Pa com 5-componentes [PT, FHA, PRN, Fimbrias - FIM2 + FIM3]) como o parceiro de DTPa básico, algumas vezes com componentes adicionais de HBV e/ou IPV. As duas combinações mais amplamente usadas, DTPa3(HB)IPV-Hib (*Infanrix®* IPV+ Hib) e DTPa5-IPV-Hib (*Pentacel™* ou *Pediacel™*) foram recentemente revistas [63]. Níveis de anticorpo anti-PRP comparáveis são induzidos pelas combinações com DTPa3 e DTPa5 (Figuras 1 e 2), os quais são menores quando comparado com vacinas contra Hib separadamente administradas. Um estudo publicado com *Pentacel™* [70] não mostrou diferença entre *Pentacel™* e Hib separados. Mesmo quando todos os dados disponíveis são considerados, a resposta anti-PRP é diminuída após vacinação primária com as vacinas combinadas *Pediacel™* e *Pentacel™* comparado com Hib separadamente administrada [71, 72, 73]: conforme observado para outras combinações de DTPa-Hib.

A despeito das menores concentrações de anticorpo anti-PRP obtidas, vacinas combinadas contra Hib baseadas em DTPa têm sido amplamente adotadas e mostram ser altamente eficazes na prevenção da doença. Os fatores que contribuem para a eficácia protetora de combinações de Hib baseadas em DTPa foram revistos por Eskola e colaboradores em 1999 [13]. Resumidamente, a imunização com vacinas combinadas contra Hib baseadas em DTPa ou vacinas baseadas em DTPa administradas separadamente com Hib resultou em >95 % dos indivíduos com níveis de anticorpo indicativos de proteção e memória imune após vacinação primária ($\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$). Respostas de memória imune similares, conforme evidenciado por níveis similares de anticorpo após reforço, se desenvolveram quando Hib é administrada separadamente ou misturada junto com vacinas

baseadas em DTPa, consistente com a observação durante estudos de eficácia no Finnish de que uma resposta de anticorpo detectável após vacinação primária é evidência de iniciação com sucesso [35, 74]. A atividade funcional da vacina baseada em DTPa administrada junto com vacinas contra Hib foi demonstrada em termos de avidéz de anticorpo, atividade bactericida, proteção passiva *in vivo* no modelo com ratos e opsonofagocitose [52, 53].

A eficácia clínica de combinações de Hib baseadas em DTPa na prevenção de doença por Hib foi conclusivamente demonstrada em países com mecanismos de inspeção compreensivos, tal como a Alemanha. Na Alemanha, vacinas contra Hib baseadas em DTPa (PRP-T) são fornecidas a 2, 3 e 4 meses de idade, com um reforço durante o segundo ano de vida. Vacinas combinadas contra Hib baseadas em DTPa têm sido usadas exclusivamente desde 1996 (1996: DTPa-Hib, 1998; DTPa-IPV-Hib, 2000; DTPa-HBV-IPV-Hib), com uma eficácia contínua estimada da vacina de 96,7% após imunização primária [62, 75].

Estudos com uma vacina combinada contra Hib baseada em DTPw mostraram maiores concentrações de anticorpo anti-PRP pós-imunização primária comparado com combinações de Hib baseadas em DTPa, mas ambos os regimes mostram altas concentrações de anticorpo pós-reforço [76]. Em anos recentes, combinações de DTPa-(HBV)-IPV-Hib e sua co-administração com vacinas de conjugados meningocócicos e pneumocócicos foram introduzidas. Isso influencia a complexidade de respostas imunes a componentes individuais e intensifica o risco de possíveis interferências entre os vários componentes.

Efeito de intensificação da vacina contra poliovírus (IPV) em uma vacina combinada baseada em DTPa

Embora tenha sido repetidamente demonstrado que vacinas combinadas DTPa-Hib mostram atividade funcional comparável à administração distinta da vacina conjugada a Hib [13, 52], há evidência para

sugerir que a presença de IPV em algumas vacinas combinadas de Hib baseadas em DTPa module a resposta imune induzida pelo componente conjugado de Hib.

Em um experimento realizado na Suécia, foi notado que as concentrações de anticorpo anti-PRP eram estatisticamente maiores significativamente após duas injeções intramusculares de PRP-T misturada com DT-IPV do que quando misturada com DT apenas [77] (Tabela 2). Durante um estudo clínico realizado na Alemanha (1996-1998), os indivíduos foram aleatoriamente distribuídos para receber vacinação primária a 3, 4 e 5 meses de idade com diversas vacinas combinadas contra Hib baseadas em DTPa3. As concentrações de anticorpo anti-PRP nos indivíduos que receberam vacinas que diferiam apenas quanto à presença ou ausência de IPV são apresentadas na Tabela 2 (resultados previamente não publicados). Embora não haja diferença entre vacinas contendo IPV e sem IPV em termos da proteção de crianças, obtendo o corte de 0,15 µg/ml, os níveis de anticorpo anti-PRP foram maiores (estatisticamente significativos para DTPa3-HBV-Hib versus DTPa3-HBV-IPV-Hib) em indivíduos que receberam combinações de Hib baseadas em DTPa3 contendo IPV. Também foi observado que as respostas de anticorpo à hepatite B são maiores em uma combinação com DTPa-IPV quando comparado com uma combinação de DTPa sem IPV (Tabela 3) [80, 81].

Um efeito de intensificação de IPV sobre a resposta de PRP nem sempre foi observado: em um estudo nos EU, a co-administração de DTPa2-Hib (PRP-T) com IPV como injeções distintas foi associada a uma resposta anti-PRP reduzida comparado com a co-administração com OPV [78]. Isso sugere um efeito imunoestimulante/adjuvante quando IPV é parte da combinação DT(Pa)Hib e, portanto, o qual estará ausente se IPV é fornecido separadamente.

Descobriu-se que a avidéz de anticorpo era reduzida após

vacinação primária com DTPa3-Hib comparado com DTPa3 e Hib separados [53, 76], um fenômeno que não é observado com combinações maiores de Hib baseadas em DTPa3 que contêm IPV [52, 53]. Resultados de avidez de bebês que participaram de três experimentos clínicos não mostram diferença na maturação de avidez de anticorpo anti-PRP entre vacinas DTPa3-HBV-IPV e Hib misturadas e separadamente administradas ou entre as vacinas Hib DTPa3-HBV-IPV-Hib e baseadas em DTPw (Tabela 4). Em contraste, houve uma diferença evidente entre a maturação de avidez após vacinação primária com DTPa3-Hib comparado com DTPa3-HBV-IPV-Hib, com um menor índice de avidez antes e após a dose de reforço de DTPa3-Hib comparado com vacina DTPa3 e Hib separadamente administradas. Nenhuma diferença foi observada na capacidade de proteger contra doença após estimulação com Hib em um ensaio de proteção de ratos bebês passiva [53]. Em um relato recente, Johnson e colaboradores [76] também notaram avidez reduzida de anticorpo após vacinação de reforço com vacina conjugada de Hib após vacinação primária com DTPa3-Hib comparado com DTPw-Hib. Em geral, os dados disponíveis sugerem que, comparadas com vacinas contendo IPV, vacinas sem IPV, tal como DTPa3-Hib, pode ter capacidade reduzida de induzir a anticorpos anti-PRP e maturação de avidez, embora a proporção de indivíduos obtendo níveis de anticorpo anti-PRP indicativos de proteção não seja alterada. Um relato Australiano recente sugeriu que DTPa3-IPV levou à respostas Th1 mais polarizadas, incluindo respostas de IgG intensificadas, quando comparado com DTPa3, confirmando a atividade adjuvante potencial do IPV [79].

25 Falhas da vacina conjugada de Hib

Em virtude do fato de vacinas conjugadas de Hib induzirem à memória imune, anticorpos funcionais e mostrarem efeitos de imunidade em massa, falhas da vacina foram descritas apenas ocasionalmente após vacinação primária. Diversos estudos demonstraram que alguns bebês

vacinados com conjugado com concentrações baixas ou indetectáveis de anticorpo ainda estavam protegidos contra doença [35, 39]. Esse grau maior do que o previsto de proteção foi atribuído, em parte, à imunidade em massa. Contudo, algum papel foi também atribuído ao efeito protetor de iniciação e memória, um efeito que foi evidente mesmo em bebês muito novos que foram vacinados de acordo com esquemas precoces e acelerados, tal como o esquema de 2, 3, 4 meses empregado no Reino Unido [13, 82]. Por outro lado, análise das respostas de anticorpo em crianças que tinham tido infecção invasiva por Hib no período pré-vacina ou aquelas que tinham recebido vacinas conjugadas de Hib indicou claramente que a memória imune apenas não foi suficiente para proteger alguns indivíduos de doença invasiva [83, 84]. Esse também foi o caso após vacinação com conjugado MenC no Reino Unido [85]. Aumentos recentes nas falhas da vacina Hib no Reino Unido gerou interesse renovado sobre os efeitos do esquema, tipo de vacina, população e interferências veículo-específicas ou associadas potenciais sobre a resposta imune e mecanismos de proteção conferidos pelas vacinas de conjugado Hib.

Interferências sobre a resposta imune à vacinas de conjugado de Hib

Interferências ou intensificações veículo-específicas podem ser explicadas via efeitos específicos de células T auxiliares e são ainda descritos abaixo. Interferências associadas são menos facilmente entendidas. Citocinas e inibidores de citocina produzidos por células T localmente em um nódulo linfático não são antigenicamente específicos e, portanto, respostas imunes a um antígeno pode interferir com as respostas imunes a outro antígeno simultaneamente administrado em uma vacina combinada fornecida no mesmo local [120]. Efeitos associados também podem ocorrer quando vacinas co-administradas contendo componentes similares são aplicadas em uma série de imunizações, tal como em esquemas pediátricos com DTPa e conjugados concomitantes empregando toxóides de difteria e/ou tétano (DT/TT) como

veículo. Na última situação, células T específicas para DT e/ou TT podem influenciar as respostas imunes, uma vez que células T podem ter trafegado, atingindo nódulos linfáticos regionais onde a vacina co-administrada é injetada [121].

5 ***Falhas da vacina de conjugado de Hib no Reino Unido***

No the Reino Unido, a vacinação de rotina contra Hib a 2, 3 e 4 meses de idade usando DTPw-Hib, sem uma dose de reforço, foi inicialmente combinada com uma campanha de adesão para atingir crianças de até 5 anos de idade. A campanha obteve grande sucesso e, entre 1989 e 1992, a eficácia global da vacina DTPw-Hib (Hib-CRM197 ou PRP-T) foi de 87,1% (CI de 95% 65,5%; 95,2%), [86]). Em um estudo de controle de caso histórico, a eficácia da vacina DTPw-Hib de 97,3% após um ano de idade foi considerada um apoio para continuação da política sem reforço empregada no Reino Unido [87]. Contudo, usando o método de seleção mais sensível, por fim se tornou evidente que a eficácia da vacina DTPw-Hib após dois anos cai de 71,7% (3,4%; 91,7%) durante a campanha de adesão para -17,0% (-272%; 63,2%) em 1998-1999 [86]. Falhas da vacina Hib em crianças >1 ano de idade foram crescentemente reportadas a partir de 1999 [88] e foram exacerbadas entre 2000 e 2002 após substituição da vacina DTPw-Hib por DTPa3-Hib, que coincidiu com a introdução e co-administração com vacina de conjugado de *N. meningitidis* sorotipo C MenC-CRM197 [89]. Em resposta à elevação observada em falhas com a vacina Hib, uma segunda campanha de adesão começou em 2003 e todas as crianças entre 6 meses e 4 anos receberam uma dose de reforço do conjugado de Hib. Uma dose de reforço da vacina conjugada de Hib é agora recomendada a 12 meses de idade como parte de um esquema de rotina [90].

Existem muitos eventos precipitantes que culminaram na elevação observada em falhas da vacina Hib no Reino Unido. Embora de tente culpar totalmente a falta de uma dose de reforço e da vacina DTPa3-Hib

empregada, a experiência no Reino Unido com vacinas conjugadas de Hib ilustra quem embora eficaz, uma vacina combinada pode ser menos efetiva em alguns ambientes.

Efeitos do esquema e reforço sobre a resposta imune à vacinas conjugadas de Hib

A capacidade das vacinas conjugadas de Hib de manter um nível mínimo de anticorpo, bem como a indução de memória sustentam a noção de que uma dose de reforço não foi necessária para proteção a longo prazo e um esquema de imunização sem um reforço no segundo ano de vida foi subsequente dotado no Reino Unido [91]. Muitos estudos estabeleceram agora a importância do reforço com Hib após uma série de vacinações primárias na geração de proteção a longo prazo contra infecção, transmissão e fortalecimento de memória imune [20, 92, 93, 94]. A ausência de uma dose de reforço foi associada a um aumento na doença por Hib [94] na Alemanha e a uma redução na prevenção de colonização por Hib [20]. Na Alemanha, vacinas de Hib baseadas em DTPa3 (PRP-T) são fornecidas no mesmo esquema precoce e acelerado de 2, 3 e 4 meses conforme aquele usado no Reino Unido, mas uma dose de reforço é fornecida durante o segundo ano de vida desde 1996. Nenhum aumento nas falhas da vacina contra Hib foi reportado, a despeito do uso exclusivo da vacina combinada de Hib baseada em DTPa [62, 75]. Muitas similaridades podem ser extraídas entre as vacinas conjugadas de Hib e conjugadas de MenC, onde se tornou evidente muito cedo no Reino Unido que a eficácia de vacinas MenC administradas na infância cai rapidamente após o primeiro ano na ausência de uma dose de reforço [85].

Avaliação do efeito da dose de reforço na Alemanha é potencialmente confundida pelo fato de que embora DTPa3-Hib tenha sido usada amplamente entre 1996 e 1998, vacinas combinadas usadas desde 1999 contêm IPV [62]. Em circunstâncias típicas, os efeitos de intensificação do

IPV sobre a resposta ao Hib provavelmente são mínimos a nível populacional: indicadores de proteção (proporção $\geq 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ [Figura 1] e proteção no modelo de estimulação com Hib em ratos bebês [53]) são similares após DTPa3-Hib e combinações de DTPa-Hib contendo IPV. Em contraste, o impacto de uma dose de reforço sobre a redução de transmissão, aumento da concentração de anticorpos, melhora da imunidade em massa e melhora da resposta imune em crianças inadequadamente protegidas é substancial a nível populacional. O papel do IPV pode ser mais importante para a imunidade populacional em situações onde a imunogenidade de DTPa3-Hib é, por alguma razão, deficiente e onde uma dose de reforço não é fornecida - conforme descrito abaixo no Reino Unido.

Vacina DTPa3-Hib

No Reino Unido, para vacinas conjugadas de Hib e MenC, as falhas ocasionais de proteção foram associadas à populações nas quais os níveis de linha de base de anticorpos anti-CP no soro provavelmente são baixos com relação àqueles níveis considerados protetores [85, 95, 96]. Esses níveis baixos ou mesmo indetectáveis de anticorpo específico podem levar a uma indivíduo suscetível à rápida invasão antes que a resposta de proteção possa ter efeito. Embora não observado no Reino Unido, menores concentrações de anticorpo ao Hib podem resultar em maiores taxas de colonização por Hib e imunidade em massa reduzida, desse modo, aumentando o risco de exposição para crianças imunizadas, parcialmente imunizadas e imunocomprometidas.

A eficácia protetora de vacinas de Hib baseadas em DTPa3 foi demonstrada e concentrações de anticorpo anti-PRP obtidas após vacinação primária com DTPa3-Hib, incluindo no Reino Unido, quando fornecida sem co-administração de MenC-CRM197, estão na mesma faixa que outras vacinas combinadas de Hib baseadas em DTPa3 e DTPa5 [63] (Figuras 1 e 2). Portanto, as razões pelas quais a vacina DTPa3-Hib demonstravelmente

imunogênica no Reino Unido exacerbou uma tendência subjacente de aumentar as falhas da vacina conjugada de Hib requer avaliação cuidadosa. Em um experimento clínico realizado no Reino Unido em 1996-1997, a resposta anti-PRP após vacinação primária com DTPa3-Hib foi satisfatória (GMC 1,56) e 96,0% das crianças obtiveram concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 5). De modo crítico, na prática, a vacina DTPa3-Hib no Reino Unido foi co-administrada com vacina MenC-CRM197 durante 1999-2000, uma co-administração que, nesse dia, não tinha sido avaliada em experimentos clínicos controlados.

Subseqüentes estudos realizados no Reino Unido sugerem fortemente uma interferência imune de MenC-CRM197 (*Meningitec*TM Wyeth Lederle Vaccines, Pearl River NY) sobre as concentrações de anticorpo anti-PRP (Tabela 5), com GMCs de anticorpo anti-PRP acentuadamente menores e uma menor proporção de indivíduos obtendo o corte de 0,15 μg em indivíduos no Reino Unido vacinados com DTPa3-Hib co-administrada com MenC-CRM197 [65, 96] do que o estudo no qual DTPa3-Hib foi administrada sozinha. Quando amostras do estudo realizado por Slack e colaboradores [96] foram testadas na GlaxoSmithKline Biologicals, a GMC de anticorpo anti-PRP foi de 0,54 $\mu\text{g/ml}$ (CI de 95% 0,34; 0,59) comparado com 1,56 (1,19; 2,04) no estudo de 1996 com DTPa3-Hib, também realizado no mesmo laboratório usando testes validados (dados previamente não publicados). Em um estudo no qual DTPa3-Hib foi co-administrada com *Meningitec*TM (MenC-CRM197), bem como vacina 9-valente pneumocócica experimental (9vPCV) que também usa CRM197 como conjugado de proteína [65], também foi descoberto que a GMC de anticorpo anti-PRP e a proporção de indivíduos com concentrações $\geq 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ (testado em laboratórios do Reino Unido) era excepcionalmente baixa (Figuras 1 e 2).

As concentrações de anticorpo anti-PRP e maturação de avides podem ser um pouco menores após iniciação com DTPa3-Hib do que com a

vacina combinada que contém IPV [53]. Um estudo cabeça-a-cabeça com DTPa3-HBV-Hib versus DTPa3-HBV-IPV-Hib demonstrou concentrações de anticorpo anti-PRP significativamente maiores após vacinação primária com a vacina contendo IPV (Tabela 2). Em experimentos clínicos, a vacina combinada DTPa3-HBV-IPV-Hib ou DTPa5-IPV-Hib co-administrada com MenC-CRM197 (*Meningitec*TM) na Alemanha [67] e no Reino Unido [89,97] resultou em concentrações de anticorpo anti-PRP similares às aquelas observadas usando DTPa-Hib apenas. Em particular, os resultados de dois estudos na Alemanha com DTPa3-HBV-IPV-Hib + MenC-CRM197 (*Menjugate*®, Chiron Emeryville, CA em [68] e *Meningitec*TM em [67]) em um esquema de 2-3-4 estão em acentuado contraste com o estudo no Reino Unido com DTPa3-Hib + MenC-CRM197 (*Meningitec*TM) administrada no mesmo esquema (GMCs de anticorpo anti-PRP de 2,60 µg/ml [68]) ou 2,78 µg/ml [67] versus 0,54 µg/ml (Tabela 5), respectivamente. Esses dados sugerem que a presença de IPV foi suficiente para disfarçar a interferência de CRM197 sobre a resposta ao Hib. Em concordância com a observação de que a resposta anti-PRP pode ser intensificada na presença de IPV (Tabela 2), outros estudos controlados na Espanha e Alemanha no quais bebês receberam vacina hexavalente DTPa3-HBV-IPV-Hib com ou sem MenC-CRM197 (*Meningitec*TM) a 2, 4 e 6 meses (Espanha [98]) ou 7vPCV-CRM197 a 2, 3 e 4 meses (Alemanha [99,100]) de idade, não mostraram diferença entre grupos quanto à resposta ao Hib com relação à proporção de indivíduos com anticorpos $\geq 0,15$ µg/ml. Em um dos estudos [100], uma menor proporção de indivíduos que obteve o corte de 1,0 µg/ml foi encontrada.

Em um estudo Canadense, quando vacinas DTPa5-IPV-Hib e 7vPCV-CRM197 foram administradas de um modo gradual com um mês de distância, a resposta de anticorpo anti-PRP foi acentuadamente reduzida [102] (Figura 1, Figura 2). Adicionalmente, descobriu-se que, quando DTPa2-HBV-IPV-Hib foi co-administrada com 7vPCV-CRM197 na Alemanha, a resposta

à hepatite B foi significativamente reduzida [103] ($p < 0,05$, t-teste 2-lateral): isso não foi encontrado quando DTPa3-HBV-IPV-Hib foi co-administrada com 7vPCV-CRM197 [99].

No entanto, há forte evidência indireta sugerindo que a
5 presença de IPV nas vacinas combinadas pentavalentes e hexavalentes elimina grandemente a interferência observada entre vacinas contendo DTPa3-Hib e CRM197. Esse efeito adjuvante (77) parece compensar grandemente a interferência de vizinhança relacionada a conjugados de CRM197 quando eles são co-administrados com vacinas de Hib baseadas em
10 DTPa (PRP-TT). Todavia, parece evidente que os efeitos de intensificação imune de IPV podem ser superados em determinadas circunstâncias, tal como administração gradual de vacinas contendo CRM197 e contendo Hib. Além disso, o efeito de CRM197 pode estar relacionado à dose, com maior interferência quando vacinas de MenC-CRM197 e 7vPNC são conjuntamente
15 co-administradas com Hib (Figura 1). Apesar da presença de IPV, DTPa2-HBV-IPV-Hib demonstrou respostas reduzidas à hepatite B quando co-administrada com 7vPCV-CRM197.

Interferências ou intensificações veículo-específicas podem ser explicadas via efeitos de células T auxiliares-específicas e são ainda descritos
20 abaixo. Interferências associadas são menos facilmente entendidas. Citocinas e inibidores de citocina produzidos por células T localmente em um nódulo linfático não são antígeno-específicos e, portanto, respostas imunes ativas a um antígeno podem interferir com as respostas imunes a outro antígeno simultaneamente administrado em uma vacina combinada administrada no
25 mesmo local (Insel, 1995, Ann. NY Acad. Sci 754, 35). Efeitos associados também ocorrem quando vacinas co-administradas contendo componentes similares são aplicadas em uma série de imunizações, tal como em esquemas pediátricos com DTPa e concomitantes conjugados empregando toxóides de difteria (DT) ou toxóides do tétano (TT) como veículo; na última situação,

células T específicas para DT e/ou TT podem influenciar as respostas imunes, uma vez que as células T pode ter trafegado, atingido nódulos linfáticos regionais onde a vacina co-administrada é injetada (Insel, 1995, Ann. NY Acad. Sci 754, 35).

5 Co-administração de múltiplas vacinas conjugadas resultou anteriormente em efeitos inesperados: maiores respostas imunes anti-PRP e anti-TT, mas respostas reduzidas a MenC foram observadas quando PRP-T foi co-administrada com MenC-TT [97]. Inversamente, quando 4vPCV-TT foi co-administrada com DTPw-PRP-T, respostas imunes a TT e Hib foram
10 inibidas de uma maneira que era inversamente proporcional à dose de TT recebida [104]. O mecanismo de intensificação ou interferência por TT antígeno-específica é possivelmente uma função de atividade de células T auxiliares, bem como da quantidade de proteína veículo e do polissacarídeo administrado [105]. Um conjugado pneumocócico 11-valente contendo sete
15 TT-conjugados demonstrou pobres respostas aos sete conjugados de TT quando co-administrados com uma combinação de DTPa-Hib, quando comparado a uma combinação de DTPw-Hib, o que sugere que as respostas de células T ao TT foram diferentes em DTPa5IPVHib quando comparado com DTPwIPVHib [105]. Esse efeito não foi encontrado para os quatro
20 conjugados de DT incluídos na 1 lvPCV.

Assim, intensificação ou interferência da resposta imune a antígenos específicos pode ser mediada por efeitos células T-específicos, bem como efeitos 'associados' não-específicos, mostrando que as consequências de co-administração de múltiplas vacinas conjugadas sobre a resposta imune são
25 complexas e difíceis de prever. A interferência de vizinhança com relação à co-administração com conjugados de CRM197 provavelmente se relaciona a mecanismos regulatórios de células T específicos para toxóide do tétano, que também está presente nas combinações de DTPa(HBV)(IPV)Hib-TT.

Fatores ambientais e populacionais

O efeito de fatores ambientais sobre as respostas imunes é pobremente entendido, mas um fenômeno bem reconhecido. Em uma publicação revendo 146 experimentos clínicos realizados com ActHib™ (PRP-T) [107], a proporção de indivíduos no Reino Unido que obtiveram concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ após vacinação primária foi de 69% (PRP-T apenas) e 73% (DTPw-PRP-T) comparado com taxas maiores que 90% nos outros estudos apresentados. Em um estudo com DTPa2-Hib (ActHib™), 82% dos indivíduos no Reino Unido obtiveram o corte de $0,15 \mu\text{g/ml}$, um quadro o qual estava na extremidade mínima da faixa reportada para combinações de Hib baseadas em DTPa3 e DTPa5 em qualquer parte. Uma possível causa de uma resposta imune deficiente ou menor à vacinação pode ser iniciação natural em virtude de colonização nasofaríngea reduzida como um resultado dos efeitos em massa do programa de imunização [42, 95, 108, 109].

Foi anteriormente reportado que 30% das crianças no Reino Unido que experimentaram falha da vacina contra Hib mostraram menores deficiências de imunoglobulinas ou subclasses que podem estar associadas à maturação retardada de responsividade de células B aos polissacarídeos [95]. Amamentação tem um efeito positivo sobre a resposta imune às vacinas conjugadas de Hib [110]. Possíveis efeitos populacionais sobre a imunidade proveniente de prática de amamentação no Reino Unido são desconhecidos.

Estudos de cinética de anticorpo após doença e vacinação com vacinas conjugadas de Hib sugere que respostas de anticorpo IgG no soro não são detectáveis antes de 3-4 dias após exposição ao antígeno, mesmo em indivíduos que já têm anticorpos [111, 112, 113]. Isso poderia ser particularmente importante se o anticorpo é pobremente funcional, em virtude de maturação de avidéz deficiente. Portanto, não é surpreendente que, para alguns indivíduos, sua memória imunológica falhe em protegê-los [114]. Diversos estudos após vacinação de bebês prematuros com vacinas

conjugadas mostraram menores respostas de anticorpo primário [96] e persistência reduzida [115]. Após a dose de reforço da vacina conjugada a 12 meses, contudo, bebês prematuros e com parto normal obtiveram os mesmos níveis de anticorpo.

5 *Efeitos da cepa de Hib*

A invasividade de uma cepa de Hib individual está relacionada à produção de CP e foi associada com a produção de múltiplas cópias das seqüências do gene *capb*; genes que estão envolvidos na expressão capsular de Hib [116]. Em um estudo por Cerquetti e colaboradores [117], uma proporção significativamente grande de cepas com múltiplas cópias de seqüências do gene *capb* (> 2 repetições) foram isoladas de pacientes do Reino Unido com falha verdadeira da vacina, comparado com crianças não vacinadas, sugerindo que o nível de expressão de polissacarídeo capsular exerce um papel na virulência das cepas.

Desde 2002, um aumento de duas-três vezes nas falhas da vacina contra Hib foi observado nos Países Baixos que, diferente do Reino Unido, afetam todas as idade [108]. Crianças nos Países Baixos receberam vacinação primária com DTPw-IPV + Hib (separado) a 2, 3 e 4 meses de idade, com um reforço a 11 meses. Até o momento, nenhuma explicação adequada para o aumento é evidente, contudo, foi sugerido que diversidade genética aumentada de Hib possa ter contribuído. Investigação de outras cepas clínicas de Hib tem fornecido evidência de que adultos trazendo cepas diversas de Hib se tornaram a fonte de infecção por Hib para crianças [118]. Nenhuma de tais alterações na diversidade genética foi registrada no Reino Unido [119]. Esses dados sugerem que, nos Países Baixos, os padrões de transmissão mudaram o período de vacinação para transmissão adulto-para-criança versus transmissão criança-para-criança no período pré-vacinação.

Opinião do Perito

Vacinas conjugadas de Hib têm influenciado profundamente a

epidemiologia da doença Hib em países onde seu uso tem se disseminado. A eficácia de todas as vacinas conjugadas de Hib foi amplamente demonstrada e diferenças entre as vacinas em termos da magnitude da resposta de anticorpo anti-PRP e avides de anticorpo não têm influenciado sua eficácia, exceto em

5 determinados grupos, tais como populações indígenas, que sofrem da doença em idades muito pequenas e que contam com obtenção de altas concentrações de anticorpo após uma única dose. Vacinas combinadas de Hib baseadas em DTPa (PRP-T) são amplamente usadas e induzem à concentrações de anticorpo comparáveis àquelas produzidas pela PRP-OMP apenas, com

10 eficácia demonstrada. Vacinas de Hib combinadas baseadas em DTPa induzem a anti-PRP com características funcionais similares àquelas de vacinas Hib administradas separadamente. Após uma revisão abrangente da literatura [63], o National Advisory Committee no Canadá concluiu recentemente que "A resposta anti-PRP parece estar associada mais com a

15 idade e esquema de administração da vacina do que com o tipo de vacina" [120, p11].

A co-administração de vacinas conjugadas pode resultar em uma intensificação ou interferência em virtude de interações veículo-específicas bem documentadas ou intensificação ou interferência de

20 vizinhança menos documentada, o mecanismo da qual ainda é pobremente compreendido. Interferência associada entre conjugados contendo DTPa-Hib e CRM-197 parece estar relacionada à dose, bem como influenciada pelo regime de vacinação. A regulação por células T de respostas a CRM197/toxóide de difteria é a provável causa; embora o mecanismo exato

25 ainda precise ser esclarecido. Quando combinações de (HBV)-IPV-Hib baseadas em DTPa3 e DTPa5 são co-administradas simultaneamente (isto é, não gradualmente) com conjugados de CRM197, nenhuma interferência foi observada (Tabela 5). A co-administração conjunta de conjugados de MenC-CRM197 e PCV-CRM197 junto com combinações de DTPa-(HBV)-IPV-Hib

permanece a ser esclarecida. Em um estudo recente de uma nova vacina combinada 9vPCV-MenC (todos conjugados a CRM197) co-administrada com DTPw e PRP-T no Reino Unido, as respostas ao Hib, difteria e MenC foram reduzidas [106], a despeito dos efeitos adjuvantes conhecidos de DTPw. A natureza imprevisível da interferência imune entre vacinas conjugadas co-administradas destaca a importância de avaliação adequada de co-administração da vacina conjugada antes de implementação em programas de saúde pública.

Embora a falta de uma dose de reforço e a implementação de DTPa3-Hib durante um período de controle sub-ótimo da doença Hib estivessem indiscutivelmente relacionados à elevação nas falhas da vacina conjugada de Hib no Reino Unido, há evidência esmagadora sugerindo que a interferência imune que ocorreu quando DTPa3-Hib foi co-administrada com MenC-CRM197 se somou ao número já crescente de falhas da vacina conjugada de Hib observadas.

De modo interessante, a interferência imune entre vacinas contendo CRM197 e conjugado de Hib parece ser modulada quando IPV está presente nas combinações de DTPa3-Hib administradas. Essa característica de maiores combinações requer investigação adicional e pode ter consequências muito práticas para autoridades que desejam co-administrar vários antígenos conjugados em uma única visita de vacinação. Além de Hib-TT, as respostas de anticorpo à hepatite B também parecem ser intensificadas quando IPV está presente na combinação de DTPa-HBV-Hib. Contudo, o efeito do adjuvante IPV parece ser insuficiente para impedir interferência com hepatite B quando DTPa2-HBV-IPV-Hib foi co-administrada com 7vPCV-CRM197.

Restam ainda muitas dúvidas a serem respondidas quanto à compreensão de respostas de anticorpo celulares e humorais em seres humanos vacinados com polissacarídeo-proteína e a complexidade das respostas imunológicas à vacinas combinadas. Testagem pós-licença em

andamento e inspeção de vacinas conjugadas de Hib, portanto, permanecem críticas para detecção precoce de circunstâncias que possam influenciar a eficácia das vacinas administradas.

Revisão de cinco anos

5 Nos próximos cinco anos, é improvável que hajam grandes alterações nas vacinas contra hepatite B e conjugadas de Hib-TT atualmente disponíveis e altamente eficazes - embora uso aumentado de vacinas de Hib-conjugado contendo menos antígeno e em novas combinações possa ser esperado. Introdução de outras combinações de DTPw-HBV-Hib em países
10 em desenvolvimento seria útil e provavelmente ocorrerá. Decisões de co-administrar vacinas conjugadas precisarão ser sustentadas por evidências de experimentos clínicos apropriadamente conduzidos para evitar conseqüências para a saúde pública amplamente negativas. A área de co-administrações pediátricas e interferências potenciais serão melhor descritas. Possíveis
15 licenças de conjugados de Hib-MenCY-TT, ACWY-DT, ACWY-CRM197, ACWY-TT, 10vPCV-Proteína D e 13vPCV-CRM197 pediátricos ocorrerão. A co-administração de combinações específicas de DTPa com vacinas conjugadas específicas pode ser recomendada para evitar interferência ou potencializar respostas imunes aos componentes da vacina nas combinações
20 de DTPa(HBV)IPV-Hib.

Infanrix™ é uma marca registrada do grupo de companhias GlaxoSmithKline. ActHib™, Pediacel™ e Pentacel™ são marcas registradas da Sanofi Aventis. Venar™ e Meningitec™ são marcas registradas da Wyeth Lederle Vaccines. Menjugate® é uma marca registrada da Chiron

25 Referências

1. World Health Organization (WHO). WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *WER*. 81, 445-52 (2006).

*Visão geral de epidemiologia de Hib e uso de vacina.

2. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev.* 13, 302-17 (2000).
- 5 3. World Health Organization. Global Programme for Vaccines and Immunization (GPV): The WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *WER.* 73, 64-8 (1998).
- 10 4. Weller PF, Smith AL, Smith DH, Anderson P. Role of immunity in the folga of bacteremia due to *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis.* 138(4), 427-36 (1978).
5. Santosham M, Reid R, Ambrosino D M e colaboradores. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b infections in high-risk infants treated with bacterial polysaccharide immune globulin. *N Engl J Med.* 317, 923-9 (1987).
- 15 6. Humphrey JH. Splenic macrophages: antigen presenting cells for T1-2 antigens. *Immunol Lett.* 11(3-4), 149-52 (1985).
7. And presentation in vivo: the microenvironment as a crucial factor. *Immunol Today.* 11(12), 436-9 (1990).
- 20 8. Hsu SM. Phenotypic expression of B lymphocytes. III. Marginal zone B cells in the spleen are characterized by the expression of Tac and alkaline phosphatase. *J Immunol.* 135(1), 123-30 (1985).
9. BJ. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. *Infect Immun.* 59(5), 1839-45 (1991).
- 25 10. Hostetter MK. Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J Infect Dis.* 153(4), 682-93 (1986).
11. Peltola H, Kayhty H, Sivonen A, Makela H. *Haemophilus*

influenzae type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100,000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics*. 60(5), 730-7 (1977).

*Experimento central de eficácia de vacina contra Hib CP.

5 12. Kayhty H, Karanko V, Peltola H, Makela PH. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no.

10 13. Eskola J, Ward J, Dagan R, Goldblatt D, Zepp F, Siegrist CA. Combined vaccination of *Haemophilus influenzae* type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis. *Lancet*. 354(9195), 2063-8 (1999).

**Revisão central da significância de menores respostas de anticorpo anti-PRP após vacinação com vacinas combinadas de Hib/DTPa-baseadas.

15 14. Schneerson R, Robbins JB, Szu SC, Yang Y. Vaccines composed of polysaccharide-protein conjugates: current status, unanswered questions and prospects for the future. Em: Towards better carbohydrate vaccines. Bell R, Torrigiani G (eds). John Wiley & Sons, New York. 307-31 (1987).

20 15. Anderson PW, Pichichero ME, Stein EC e colaboradores. Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal group and hapten loading on the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of *Haemophilus influenzae* type b capsular antigen unterminally coupled to the diphtheria protein CRM197. *J Immunol*. 142(7), 2464-8 (1989).

25

16. Berkowitz CD, Ward JI, Meier K e colaboradores. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccines in children 15 to 24 months of age. *J Pediatr*. 110(4), 509-14(1987).

17. Shackelford PG, Granoff DM, Nelson SJ, Scott MG, Smith DS, Nahm MH. Subclass distribution of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J Immunol.* 138(2), 587-92 (1987).

18. Granoff DM, Sheetz KE, Nahm MH, Madassery JV, Shackelford PG. Further immunologic evaluation of children who develop haemophilus disease despite previous vaccination with type b polysaccharide vaccine. *Monogr Allergy.* 23, 256-68 (1988).

19. Weinberg GA, Einhorn MS, Lenoir AA, Granoff PD, Granoff DM. Immunologic priming to capsular polysaccharide in infants immunized with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-Neisseria meningitidis outer membrane protein conjugate vaccine. *J Pediatr.* 111(1), 22-7 (1987).

20. Kayhty H. Difficulties in establishing a serological correlate of protection after immunization with *Haemophilus influenzae* conjugate vaccines. *Biologicals.* 22(4), 397-402 (1994).

**Chave: revisão relacionado dados clínicos e de anticorpo no soro.

21. Makela O, Mattila P, Rautonen N, Seppala I, Eskola J, Kayhty H. Isotype concentrations of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide (Hib) in young adults immunized with the polysaccharide as such or conjugated to a protein (diphtheria toxoid). *J Immunol.* 139(6), 1999-2004 (1987).

22. Morell A, Skvaril F, Hitzig WH, Barandun S. IgG subclasses: development of the serum concentrations in "normal" infants and children. *J Pediatr.* 80(6), 960-4 (1972).

23. Barington T, Juul L, Gyhrs A, Heilmann C. Heavy-chain isotype patterns of human antibody-secreting cells induced by *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in relation to age and preimmunity. *Infect Immun.* 62(8), 3066-74(1994).

24. Ambrosino DM, Sood SK, Lee MC e colaboradores. IgG1, IgG2 and IgM responses to two *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccines in young infants. *Pediatr Infect Dis J.* 11, 855-9 (1992).
25. Granoff DM, Shackelford PG, Holmes SJ, Lucas AH.
5 Variable region expression in the antibody responses of infants vaccinated with *Haemophilus influenzae type b* polysaccharide-protein conjugates. Description of a new lambda light chain-associated idiotype and the relation entre idiotype expression, avidity and vaccine formulation. The Collaborative Vaccine Study Group. *J Clin Invest.* 91(3), 788-96 (1993).
- 10 26. Bulkow LR, Wainwright RB, Letson GW, Chang SJ, Ward JI. Comparative immunogenicity of four *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccines in Alaska Native infants. *Pediatr Infect Dis J.* Junho de 1993; 12(6): 484-92.
- 15 27. Eskola J, Kayhty H, Peltola H e colaboradores. Antibody levels achieved in infants by course of *Haemophilus influenzae type b* polysaccharide/diphtheria toxoid conjugate vaccine. *Lancet.* 1(8439), 1184-6 (1985).
- 20 28. Decker MD, Edwards KM, Bradley R, Palmer P. Comparative trial in infants of four conjugate *Haemophilus influenzae type b* vaccines. *J Pediatr.* 120(2 Pt 1), 184-9(1992).
- 25 29. Carlsson RM, Claesson BA, Lagergard T, Kayhty H. Serum antibodies against *Haemophilus influenzae type b* and tetanus at 2,5 years of age: a follow-up of 2 different regimens of infant vaccination. *Scand J Infect Dis.* 28(5), 519-23 (1999).
30. Jelonek MT, Chang SJ, Chiu CY, Park MK, Nahm MH, Ward JI. Comparison of naturally acquired and vaccine-induced antibodies to *Haemophilus influenzae type b* capsular polysaccharide. *Infect Immun.* 61(12), 5345-50 (1993).
31. Decker MD, Edwards KM, Bradley R, Palmer P.

Responses of children to booster immunization with their primary conjugate *Haemophilus influenzae type b* vaccine ou with polyribosylribitol phosphate conjugated with diphtheria toxoid. *J Pediatr*. 122(3), 410-3 (1993).

32. Schlesinger Y, Granoff DM. Avidity and bactericidal activity of antibody elicited by different *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccines. The Vaccine Study Group. *JAMA*. 267(11), 1489-94 (1992).

33. Lucas AH, Granoff DM. Functional differences in idiotypically defined IgG1 anti-polysaccharide antibodies elicited by vaccination with *Haemophilus influenzae type b* polysaccharide-protein conjugates. *J Immunol*. 154(8), 4195-202 (1995).

34. Ward J, Brenneman G, Letson GW, Heyward WL. Limited efficacy of a *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccine in Alaska Native infants. The Alaska *H. influenzae* Vaccine Study Group. *N Engl J Med*. 323(20), 1393-401 (1990).

35. Eskola J, Kayhty H, Takala AK e colaboradores. A randomized, prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae type b* disease. *N Engl J Med*. 323(20), 1381-7 (1990).

36. Peltola H, Eskola J, Kayhty H, Takala AK, Makela PH. Clinical comparison of the *Haemophilus influenzae type b* polysaccharide-diphtheria toxoid and the oligosaccharide-CRM 197 protein vaccines in infancy. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 148(6), 620-5 (1994).

37. Black SB, Shinefield HR, Fireman B, Hiatt R, Polen M, Vittinghoff E. Efficacy in infancy of oligoconjugate of saccharide *Haemophilus influenzae type b* (HbOC) vaccine in a United States population of 61,080 children. The Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Pediatrics Group. *Pediatr Infect Dis J*. 10(2), 97-104 (1991).

38. Santosham M, Rivin B, Wolff M e colaboradores.

Prevention of *Haemophilus influenzae* type b infections in Apache and Navajo children. *J Infect Dis.* 165 Supl 1, S144-51 (1992).

39. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL e colaboradores. Decline of childhood *Haemophilus influenzae type b* (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA.* 269(2), 221-6 (1993).

40. Barbour ML. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae type b*. *Emerg Infect Dis.* 2(3), 176-82 (1996).

41. Takala AK, Eskola J, Leinonen M e colaboradores. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae type b* (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 164(5), 982-6 (1991).

42. Murphy TV, Pastor P, Medley F, Osterholm MT, Granoff DM. Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated with *Haemophilus influenza type b* conjugate vaccine. *J Pediatr.* 122(4), 517-23 (1993).

43. Adegbola RA, Mulholland EK, Secka O, Jaffar S, Greenwood BM. Vaccination with a *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *influenzae type b* among Gambian children. *J Infect Dis.* 177(6), 1758-61 (1998).

44. Kauppi M, Eskola J, Kayhty H. Anti-capsular polysaccharide antibody concentrations in saliva after immunization with *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 14(4), 286-94 (1995).

45. Barbour ML, Booy R, Crook DW e colaboradores. *Haemophilus influenzae type b* carriage and immunity four years after receiving the *Haemophilus influenzae* oligosaccharide-CRM 197 (HbOC) conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 12(6), 478-84 (1993).

46. Mohle-Boetani JC, Ajello G, Breneman E e colaboradores. Carriage of *Haemophilus influenzae type b* in children after widespread

vaccination with conjugate *Haemophilus influenzae type b* vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 12(7), 589-93 (1993).

47. Käyhty H, Peltola H, Karanko V, Mäkelä PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae type b*. *J Infect Dis.* 147, 1100 (1983).

48. Anderson P. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae type b*. *J Infect Dis.* 149(6), 1034-5 (1984).

49. Granoff DM. Assessing efficacy of *Haemophilus influenzae type b* combination vaccines. *Clin Infect Dis.* 33 Supl 4, S278-87 (2001).

50. Singleton R, Hammitt L, Hennessy T e colaboradores. The Alaska *Haemophilus influenzae type b* experience: lessons in controlling a vaccine-preventable disease. *Pediatrics.* 118(2), e421-9 (2006).

51. Pichichero ME, Voloshen T, Zajac D, Passador S. Avidity maturation of antibody to *Haemophilus influenzae type b* (Hib) after immunization with diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hib-hepatitis B combined vaccine in infants. *J Infect Dis.* 180(4), 1390-3 (1999).

52. Poolman J, Kaufhold A, of Grave D, Goldblatt D. Clinical relevance of lower Hib response in DTPa-based combination vaccine. *Vaccine.* 19(17-19), 2280-5 (2001).

**Chave: "paper" mostrando a avidez do anticorpo e atividade bactericida não são diferentes entre vacinas de Hib separadamente administradas ou DTPa-baseadas misturadas contendo IPV.

53. Denoel PA, Goldblatt D, Vleeschauwer I, Jacquet J-M, Pichichero ME, Poolman JT. Quality of the *Haemophilus influenzae type b* antibody response induced by DTPa/Hib combination vaccine. *Clin Vacc Immunol.*

**Ilustra as diferenças entre vacinas contendo IPV e não

contendo IPV em termos de parâmetros *in vitro*.

54. Bredius RG, Driedijk PC, Schouten MF, Weening RS, Out TA. Complement activation by polyclonal immunoglobulin G1 and G2 antibodies against *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae type b* and tetanus toxoid. *Infect Immun.* 60(11), 4838-47 (1992).

55. Amir J, Scott MG, Nahm MH, Granoff DM. Bactericidal and opsonic activity of IgG1 and IgG2 anticapsular antibodies to *Haemophilus influenzae type b*. *J Infect Dis.* 162(1), 163-71 (1990).

56. Goldblatt D, Miller E, McCloskey N, Cartwright K., Immunological response to conjugate vaccines in infants: follow up study. *BMJ.* 316, 1570-1 (1998).

57. Richmond P, Borrow R, Goldblatt D e colaboradores. Ability of 3 different meningococcal C conjugate vaccines to induce immunologic memory after a single dose in UK toddlers. *J Infect Dis.* 183(1), 160-3 (2001).

58. Pallares DE, Figueroa JE, Densen P, Giclas PC, Marshall GS. Invasive *Haemophilus influenzae type b* infection in a child with familial deficiency of the beta subunit of the eighth component of complement. *J Pediatr.* 128(1), 102-3 (1996).

59. Musher D, Goree A, Murphy T e colaboradores. Immunity to *Haemophilus influenzae type b* in young adults: correlation of bactericidal and opsonizing activity of serum with antibody to polyribosylribitol phosphate and lipooligosaccharide before and after vaccination. *J Infect Dis.* 154(6), 935-43 (1986).

60. Schmitt HJ, Zepp F, Muschenborn S e colaboradores. Immunogenicity and reactogenicity of a *Haemophilus influenzae type b* tetanus conjugate vaccine when administered separately ou mixed with concomitant diphtheria-tetanus-toxoid and acellular pertussis vaccine for primary and for booster immunizations. *Eur J Pediatr.* 157(3), 208-14 (1998).

61. Halperin SA, King J, Law B, Mills E, Willems P. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae-tetanus* toxoid conjugate vaccine given separately ou in combination with a three-component acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids and inactivated poliovirus vaccine for the first four doses. *Clin Infect Dis*. 28(5), 995-1001 (1999).

62. Schmitt HJ, von Kries R, Hassenpflug B e colaboradores. *Haemophilus influenzae type b* disease: impact and effectiveness of diphtheria-tetanus toxoids-acellular pertussis (-inactivated poliovirus)/ *H. influenzae type b* combination vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. Agosto de 2001; 20(8): 767-74.

63. Gilca V, Duval B. *Literature review on DTaP based penta- and hexavalent vaccines approved for clinical uso in Canada*. Institut national of santé publique du Quebec, Canadá (2006).

64. Schmitt HJ, Faber J, Lorenz I, Schmole-Thoma B, Ahlers N. The safety, reactogenicity and immunogenicity of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (7VPnC) concurrently administered with a combination DTaP-IPV-Hib vaccine. *Vaccine*. 21(25-26), 3653-62 (2003).

65. Goldblatt D, Southern J, Ashton L e colaboradores. Immunogenicity and boosting after a reduced número of doses of a pneumococcal conjugate vaccine in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J*. 25(4), 312-9 (2006).

*Experimento clínico mostrando evidência de interferência de vizinhança por CRM197.

66. Schmitt HJ, Knuf M, Ortiz E, Sanger R, Uwamwezi MC, Kaufhold A. Primary vaccination of infants with diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated polio virus and *Haemophilus influenzae type b* vaccines given as either separate ou mixed injections. *J Pediatr*. 137(3), 304-12 (2000).

67. Schmitt HJ, Maechler G, Habermehl P e colaboradores. Immunogenicity, reactogenicity and immune memory after primary vaccination with a novel *Haemophilus influenzae-Neisseria meningitidis* serogroup C conjugate vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 7 de Fevereiro, (2007).

68. Habermehl P, Leroux-Roels G, Sanger R, Machler G, Boutriau D. Immunogenicity and Reactogenicity of a combined *Haemophilus influenzae* Type b and *Neisseria meningitidis* serogroup C and Y-tetanus toxoid conjugate (Hib-MenCY-TT) vaccine administered as a primary at 2, 3 and 4 months and as a booster at second year of life. Abstract. 15th International Pathogenic Neisseria Conference, Cairns, Australia, 10-15 de Setembro (2006).

69. Halperin BA, Halperin SA, McGrath P, Smith B, Houston T. Use of lidocaine-prilocaine patch to decrease intramuscular injection pain does not adversely affect the antibody response to diphtheria-tetanus-acellular pertussis-inactivated *poliovirus-Haemophilus influenzae type b* conjugate and hepatitis B vaccines in infants from birth to six months of age. *Pediatr Infect Dis J.* 21(5), 399-405 (2002).

70. Mills E, Gold R, Thipphawong J e colaboradores. Safety and immunogenicity of a combined five-component pertussis-diphtheria-tetanus-inactivated poliomyelitis-*Haemophilus b* conjugate vaccine administered to infants at two, four, and six months of age. *Vaccine.* 16(6), 576-85 (1998).

71. Lin TY, Wang YH, Chang LY e colaboradores. A fully liquid diphtheria-tetanus-five component acellular pertussis-inactivated poliomyelitis-*Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccine: immunogenicity and safety of primary vaccination in Taiwanese infants. *Int J Infect Dis.* 9 de Junho (2006).

72. Lee CY, Thipphawong J, Huang LM e colaboradores. An

evaluation of the safety and immunogenicity of a five-component acellular pertussis, diphtheria and tetanus toxoid vaccine (DTaP) when combined with a *Haemophilus influenzae type b*-tetanus toxoid conjugate vaccine (PRP-T) in Taiwanese infants. *Pediatrics* 103(1), 25-30 (1999).

5 73. Pentacel® DTaP-IPV/Hib Combined Diphtheria and Tetanus Toxoids and Acellular Pertussis Adsorbed, Inactivated Poliovirus and Haemophilus b Conjugate (Tetanus Toxoid Conjugate) Vaccine Combined. VRBPAC Briefing Document. Versão 2: 2006.

10 74. Kayhty H, Eskola J, Peltola H, Saarinen L, Makela PH. High antibody responses to booster doses of either *Haemophilus influenzae* capsular polysaccharide or conjugate vaccine after primary immunization with conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 165 Supl 1, SI65-6 (1992).

15 75. Kalies H, Verstraeten T, Grote V e colaboradores. Four and one-half-year follow-up of the effectiveness of diphtheria-tetanus toxoids-acellular pertussis/*Haemophilus influenzae type b* and diphtheria-tetanus toxoids-acellular pertussis-inactivated poliovirus/H. *influenzae type b* vacina combinada in Germany. *Pediatr Infect Dis J.* 23(10), 944-50 (2004).

20 *"Paper" que ilustra a eficácia em andamento de vacinas combinadas DTPa-baseadas/Hib na prevenção de doença por Hib na Alemanha (esquema de 2-3-4 meses).

 76. Johnson NG, Ruggeberg JU, Balfour GF e colaboradores. *Haemophilus influenzae type b* reemergence after combination immunization. *Emerg Infect Dis.* 12(6), 937-41 (2006).

25 77. Carlsson RM, Claesson BA, Kayhty H, Selstam U, Iwarson S. Studies on a Hib-tetanus toxoid conjugate vaccine: effects of co-administered tetanus toxoid vaccine, of administration route and of combined administration with an inactivated polio vaccine. *Vaccine.* 18(5-6), 468-78 (1999).

 78. Rennels MB, Englund JA, Bernstein DI e colaboradores.

Diminution of the anti-polyribosylribitol phosphate response to a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis/*Haemophilus influenzae type b* vaccine by concurrent inactivated poliovirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 19(5), 417-23 (2000).

5 79. Rowe J, Yerkovich ST, Richmond P e colaboradores. Th2-associated local reactions to the acellular diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in 4- to 6-year-old children. *Infect Immun.* 73(12), 8130-5 (2005).

 80. Yeh SH, Ward JI, Partridge S e colaboradores. Safety and immunogenicity of a pentavalent diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and
10 polio combination vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J.* 20(10), 973-80 (2001).

 81. Blatter MM, Reisinger KS, Terwelp DR, DelBuono FJ, Howe BJ. Immunogenicity of a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis (DT-tricomponent Pa) - hepatitis B (HB)-inactivated poliovirus
15 (IPV) admixed with *Haemophilus influenzae type b* (Hib) vaccine in infants. Abstract 813. American Pediatric Society and the Society for Pediatric Research. New Orleans, EUA. 1-5 de Maio (1998).

 82. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccines. *Immunology.* 113(2), 163-74 (2004).

20 83. Anderson P, Ingram DL, Pichichero ME, Peter G. A high degree of natural immunologic priming to the capsular polysaccharide may not prevent *Haemophilus influenzae type b* meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* 19(7), 589-91 (2000).

 84. McVernon J, Andrews N, Slack MP, Ramsay ME. Risk of
25 vaccine failure after *Haemophilus influenzae type b* (Hib) combination vaccine with acellular pertussis. *Lancet.* 361(9368), 1521-3 (2003).

 85. Trotter CL, Andrews NJ, Kaczmarski EB, Miller E, Ramsay ME. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet.* 364(9431), 365-7 (2004).

*Ilustra a imunidade adquirida após vacinação primária com vacinas conjugadas a MenC sem reforço.

86. Ramsay ME, McVernon J, Andrews NJ, Heath PT, Slack MP. Estimating *Haemophilus influenzae* type b vaccine effectiveness in England and Wales by use of the screening method. *J Infect Dis.* 188(4), 481-5 (2003).

*Chave: "Paper resumindo falhas na vacina contra Hib no Reino Unido desde a introdução de vacinas conjugadas.

87. Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ e colaboradores. Antibody concentration and clinical protection after Hib conjugate vaccination in the United Kingdom. *JAMA.* 84(18), 2334-40 (2000).

88. Heath PT, McVernon J. The UK Hib vaccine experience. *Arch Dis Child.* 86(6), 396-9 (2002).

89. Slack MH, Cade S, Schapira D e colaboradores. DT5aP-Hib-IPV and MCC vaccines: preterm infants' response to accelerated immunization. *Arch Dis Child.* 90(4), 338-41 (2005).

*Experimento clínico mostrando evidência de interferência de vizinhança por CRM197.

90. Cameron C, Pebody R. Introduction of pneumococcal conjugate vaccine to the UK childhood immunization programme, and changes to the meningitis C and Hib schedules. *Euro Surveill.* 11(3), E060302.4 (2006).

91. Booy R, Heath PT, Slack MP, Begg N, Moxon ER. Vaccine failures after primary immunization with *Haemophilus influenzae* type-b conjugate vaccine without booster. *Lancet.* 349(9060), 1197-202 (1997).

92. Steinhoff M, Goldblatt D. Conjugate Hib vaccines. *Lancet.* 361(9355), 360-1 (2003).

93. Makela PH, Kayhty H. Evolution of conjugate vaccines.

Expert Rev Vaccines. 1(3), 399-410 (2002).

94. von Kries R, Bohm O, Windfuhr A. *Haemophilus influenzae* b-vaccination: the urgency for timely vaccination. *Eur J Pediatr*. 156(4), 282-7 (1997).

5 *Ilustra a importância de vacinação com reforço na prevenção de falhas da vacina contra Hib.

95. Heath PT, Booy R, Griffiths H e colaboradores. Clinical and immunological risk factors associated with *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccine failure in childhood. *Clin Infect Dis*. 31(4), 973-80
10 (2000).

96. Slack MH, Schapira D, Thwaites RJ e colaboradores. Immune response of premature infants to meningococcal serogroup C and combined diphtheria-tetanus toxoids-acellular *pevtussis-Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccines. *J Infect Dis*. 184(12), 1617-20(2001).

15 *Experimento clínico mostrando evidência de interferência de vizinhança a CRM197.

97. Kitchin N, Southern J, Morris R e colaboradores. Evaluation of a diphtheria-tetanus-acellular pertussis-inactivated poliovirus-Hib vaccine given concurrently with meningococcal group C conjugate
20 vaccine at 2, 3 and 4 months of age. *Arch Dis Child*. 2 de Maio (2006).

98. Tejedor JC, Omenaca F, Garcia-Sicilia J e colaboradores. Immunogenicity and reactogenicity of a three-dose primary vaccination course with a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B-inactivated *polio-haemophilus influenzae type b* vaccine coadministered with
25 a meningococcal C conjugate vaccine. *Pediatr Infect DisJ*. 23(12), 1109-15(2004).

99. Knuf M, Habermehl P, Cimino C, Petersen G, Schmitt HJ. Immunogenicity, reactogenicity and safety of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) concurrently administered with a DTPa-HBV-

IPV/Hib combination vaccine in healthy infants. *Vaccine*. 24(22), 4727-36 (2006).

100. Tichmann-Schumann I, Soemantri P, Behre U, Disselhoff J, Mahler H, Maechler G, Sanger R, Jacquet JM, Schuerman L. Immunogenicity and reactogenicity of four doses of diphtheria-tetanus-three-component acellular pertussis-hepatitis B-inactivated polio *vims-Haemophilus influenzae type b* vaccine coadministered with 7-valent pneumococcal conjugate Vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 24(1), 70-7 (2006).

101. Halperin SA, McDonald J, Samson L e colaboradores. Simultaneous administration of meningococcal C conjugate vaccine and diphtheria-tetanus-acellular pertussis-inactivated *poliovims-Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccine in children: a randomized double-blind study. *Clin Invest Med*. 25(6): 243-51 (2002).

102. Scheifele DW, Halperin SA, Smith B, Ochnio J, Meloff K, Duarte-Monteiro D. Assessment of the compatibility of co-administered 7-valent pneumococcal conjugate, DTaP/IPV/PRP-T Hib and hepatitis B vaccines in infants 2-7 months of age. *Vaccine*. 24(12), 2057-64 (2006).

*Experimento clínico mostrando evidência de interferência de vizinhança por CRM197.

103. Olivier C, Liese JG, Stojanov S, Tetelboum R, Cottard M, Fritzell B, Laufer D, Petersen G, Corsaro B, Belohradsky. Immunogenicity and safety of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (7vPNC-Prevenar®) coadministered with a hexavalent DTaP-IPV-HBV-Hib Vaccine (Hexavac ®). Poster G-836. The 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, California. 27-30 de Setembro (2002).

104. Dagan R, Eskola J, Leclerc C, Leroy O. Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants. *Infect Immun*. 66(5), 2093-8 (1998).

105. Dagan R, Goldblatt D, Maleckar JR, Yaich M, Eskola J. Reduction of antibody response to an 11-valent pneumococcal vaccine coadministered with a vaccine containing acellular pertussis components. *Infect Immun.* 72(9), 5383-91 (2004).
- 5 106. Buttery JP, Riddell A, McVernon J e colaboradores. Immunogenicity and safety of a combination pneumococcal-meningococcal vaccine in infants: a randomized controlled trial. *JAMA.* 293(14), 1751-8 (2005).
- 10 107. Vidor E, Hoffenbach A, Fletcher MA. *Haemophilus influenzae type b* vaccine: reconstitution of lyophilised PRP-T vaccine with a pertussis-containing paediatric combination vaccine or a change in the primary series immunization schedule, may modify the serum anti-PRP antibody responses. *Curr Med Res Opin.* 17(3), 197-209 (2001).
- 15 108. Spanjaard L, van den Hof S, of Melker HE, Vermeer-de Bondt PE, van der Ende A, Rijkers GT. Increase in the number of invasive *Haemophilus influenzae type b* infections. *Ned Tijdschr Geneesk.* 149(49), 2738-42 (2005).
- 20 109. McVernon J, Howard AJ, Slack MP, Ramsay ME. Long-term impact of vaccination on *Haemophilus influenzae type b* (Hib) carriage in the United Kingdom. *Epidemiol Infect.* 132(4), 765-7 (2004).
110. Pabst HF, Spady DW. Effect of breast-feeding on antibody response to conjugate vaccine. *Lancet.* 4 de Agosto de 1990; 336 (8710): 269-70.
- 25 111. Borrow R, Southern J, Andrews N e colaboradores. Comparison of antibody kinetics following meningococcal serogroup C conjugate vaccine entre healthy adults previously vaccinated with meningococcal A/C polysaccharide vaccine and vaccine-naive controls. *Vaccine.* 19(23-24), 3043-50 (2001).
112. Madore DV, Johnson-Kraines CL, Rothstein EP, Smith

DH. Kinetics of antibody response to *Haemophilus influenzae type b* vaccines. Pennridge Pediatric Associates. *Curr Méd Res Opin.* 15(2), 105-12 (1999).

113. Pichichero ME, Voloshen T, Passador S. Kinetics of booster responses to *Haemophilus influenzae type b* conjugate after combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis-*Haemophilus influenzae type b* vaccination in infants. *Pediatr Infect Dis J.* 18(12), 1106-8 (1999).

114. Lucas AH, Granoff DM. Imperfect memory and the development of *Haemophilus influenzae type b* disease. *Pediatr Infect Dis J.* 20(3), 235-9 (2001).

115. Heath PT, Booy R, McVernon J e colaboradores. Hib vaccination in infants born prematurely. *Arch Dis Child.* 88(3), 206-10 (2003).

116. Corn PG, Anders J, Takala AK, Kayhty H, Hoiseth SK. Genes involved in *Haemophilus influenzae type b* capsule expression are frequently amplified. *J Infect Dis.* 167(2), 356-64 (1993).

117. Cerquetti M, Cardines R, Ciofi Degli Atti ML e colaboradores. Presence of multiple copies of the capsulation b locus in invasive *Haemophilus influenzae type b* (Hib) strains isolated from children with Hib conjugate vaccine failure. *J Infect Dis.* 192(5), 819-23 (2005).

118. Schouls LM, van der Ende A, van of Pol I, Schot C, Spanjaard L, Vauterin P, Wilderbeek D, Witteveen S. Increase in genetic diversity of *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) strains after introduction of Hib vaccination in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 43(6), 2741-9 (2005).

119. Aracil B, Slack M, Perez-Vazquez M, Roman F, Ramsay M, Campos J. Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae type b* causing vaccine failures in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 44(5), 1645-9 (2006).

120. National Advisory Committee on Immunization (NACI). Statement on the recommended use of pentavalent and hexavalent vaccines. *CCDR*: 33 (2007).

121. Insel RA. Potential alterations in immunogenicity by combining ou simultaneously administering vaccine components. *Ann N Y Acad Sci*. 754, 35-47 (1995).

122. Avdicova M, Prikazsky V, Hudeckova H, Schuerman L, Willems P. Immunogenicity and reactogenicity of a novel hexavalent DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine compared to separate concomitant injections of DTPa-IPV/Hib and HBV vaccines, when administered according to a 3, 5 and 11 month vaccination schedule. *Eur J Pediatr*. Novembro de 2002; 161(11): 581-7.

123. Pichichero ME, Bernstein H, Blatter MM, Schuerman L e colaboradores. Immunogenicity and safety of a combination diphtheria, tetanus toxoid, acellular pertussis, hepatitis b and inactivated poliovirus vaccine coadministered with a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and a *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccine. *J Pediatr*. in Press.

124. Aristegui J, Dal-Re R, Diez-Delgado J e colaboradores. Comparison of the reactogenicity and immunogenicity of a combined diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated polio (DTPa-HBV-IPV) vaccine, mixed with the *Haemophilus influenzae type b* (Hib) conjugate vaccine and administered as a single injection, with the DTPa-IPV/Hib and hepatitis B vaccines administered in twosimultaneous injections to infants at 2, 4 and 6 months of age. *Vaccine*. 8 de Setembro de 2003; 21(25-26): 3593-600.

Figura 1: Resultados de experimentos clínicos individuais com vacinas combinadas de Hib-TT DTPa3- e DTPa5-baseadas. Proporção de indivíduos com concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ após vacinação primária com 3 doses.

*Dados não disponíveis.

Figura 2: Resultados de experimentos clínicos individuais com vacinas combinadas de Hib-TT DTPa3- e DTPa5-baseadas. GMCs de anticorpo anti-PRP ($\mu\text{gg/ml}$) após vacinação primária com 3 doses.

5 Maiores e menores valores de GMC apresentados a partir de [69].

Dados para as Figuras 1 e 2 adaptados de [60, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 72, 73].

Tabela 1: Estudos de eficácia e efetividade de vacinas conjugadas de Hib com respostas de anticorpo no soro em bebês após imunização primária

Vacina	País	Esquema	N	Anti-PRP µg/ml (Vacinação primária)	Eficácia %	(CI de 95%)
Design (controle)	(ano)	Primário (reforço)		%>0,15	GMC	Primária
PRP-D				%>1,0		Reforço
RCP	EU (Alasca)	2-4-6	2102	48(%>0,1)	0,18	35 (-57; 73)
(placebo)	1984-88 [34]					-
RCP	Finlândia	3-4-6 (14-18)	11400	68	0,53	90 (70; 96)
(não vacinado)	1985-87 [35]					94 (83; 98)
RH	Finlândia	1988-91 4-6 (14-18)	60500	73	0,63	87 (69; 96)
	[36]					100 (88; 100)
Hib-CRM197						
CP	US	2-4-6	51480	100	18.9	100 (68; 100)
(não vacinado)	1988-90 [37]					-
RH	Finlândia	1988-91 4-6 (14-18)	56500	100	4.32	95 (76; 99)
	[36]					100 (87; 100)
PRP-OMP						
RCP	EU (Navajo)	2-4	735	91	1.35	95 (72; 99)
(placebo)	1988-90 [38]					-

R- randomizado, C- controlado, P- prospectivo, H- Controle históricos, N: número arrolado, GMC - concentração média geométrica de anticorpo anti-PRP.

Tabela 2: Efeito de IPV sobre as concentração de anticorpo anti-PRP um mês após vacinação primária com Hib-TT (resultados anteriormente não publicados)

Vacina (sem IPV)	N	≥0,15 %	≥1,0 %	GMC	CI 95%	de	Vaccine (misturada N com IPV)	≥ µg/ml %	0,15 ≥ 1,0 µg/ml %	GMC	CI de 95%
Vacinação primária a 3, 4 e 5 meses de idade na Alemanha											
DTPa3-HBV-Hib + OPV 48 93,8 45,8 1,108* 0,726-1,690											
DTPa3-Hib+HBV + OPV 40 97,5 72,5 1,817 1,211-2,727											
Vacinação primária a 3 e 5 meses de idade na Suécia [77] DT/Hib + IPV 92 83 48† 0,8**											
DT/Hib/IPV 91 90 65† 2,0** -											

N = número de indivíduos testados, % = número/percentual de indivíduos com concentrações acima do corte
 CI de 95% = intervalos de confiança de 95%, limite mínimo e máximo, diferença estatisticamente significativa entre grupos: *CI de 95% para a proporção de GMC entre grupos não inclui 1 (0,51 [0,30; 0,86]), ** P<0,01 t-teste não emparelhado, † P<0,01 teste qui-quadrado

Tabela 3: Efeito de IPV sobre a resposta imune à hepatite B após vacinação primária a 2, 4 e 6 meses de idade

Vacina (IPV separada)	N	% $\geq$ 10 mIU/ml	GMC	CI de 95%	Vacina (IPV misturada)	N	% $\geq$ 10 mIU/ml	GMC	CI de 95%
Estados Unidos [81]									
DTPa3 + HBV + Hib + OPV	98	100	934,3	728,1; 1198,8	DTPa3-HBV-IPV-Hib	106	99	1239,5	925,0; 1661,0
Estados Unidos [80]									
DTPa3 + HBV + Hib + OPV	77	100	804,9*	617,0; 1049,9	DTPa3-HBV-IPV+Hib*	89	100	1661,2*	1255,8; 2197,5
DTPa3-HBV + IPV+Hib	79	98,7	918,6*	669,7; 1259,9					
Eslováquia [122]									
HBV+DTPa3-IPV-Hib**	138	82,6	82,4*	60,2; 112,7	DTPa3-HBV-IPV-Hib**	141	96,4	593,2*	450,9; 780,5
Estados Unidos [123]									
DTPa3 + HBV + IPV + PRP-CRM197 + 7vPCV-CRM197	154	98,7	667,5*	534,1; 834,3	DTPa3-HBV-IPV + PRP-CRM197 + 7vPCV-CRM197	167	98,2	1123,6*	912,0;1384,2
Espanha [124]									
DTPa-IPV-Hib + HBV	31	100	1826,8	1246,4; 2677,4	DTPa-HBV-IPV-Hib	40	97,5	970	573,4; 1640,8

N = número de indivíduos testados, % = número/percentual de indivíduos com concentrações acima do corte

* $p < 0,01$ IPV-separada versus grupo com IPV-misturada usando t-teste 2-lateral. Para todas as outras comparações de GMC $p > 0,05$. ** pós-dose 2.

Tabela 4: Índice de avidéz por média geométrica (GMAI) de anticorpos IgG anti-PRP em três experimentos clínicos (adaptados de [53])

Estudo	Grupo	N	GMAI (CI de 95%)	† P=
<i>Estudo 1: vacinação primária a 2-4-6 meses com reforço a 15-18 meses</i>				
Pós-primária	DTPa3 + Hib	33	0,094 (0,092-0,096)	1
	DTPa3-Hib	45	0,094 (0,094-0,095)	
Pré-reforço	DTPa3 + Hib	21	0,292 (0,221-0,387)	0,0189
	DTPa3-Hib	18	0,183 (0,138-0,242)	
Pós-reforço	DTPa3 + Hib	31	0,252 (0,202-0,313)	0,0000
	DTPa3-Hib	59	0,126 (0,115-0,138)	
<i>Estudo 2: vacinação primária a 3-4-5 meses com reforço a 15-27 meses</i>				
Pós-primária	DTPa3 + HBV + OPV + 40 Hib*		0,126 (0,106-0,150)	0,0794
	DTPa3-HBV-IPV-Hib	40	0,105 (0,094-0,118)	
Pré-reforço	DTPa3 + Hib*	21	0,192 (0,143-0,257)	0,8164
	DTPa3-Hib	23	0,183 (0,135-0,250)	
Pós-reforço	DTPa3 + Hib*	34	0,189 (0,145-0,246)	0,8067
	DTPa3-Hib	37	0,182 (0,136-0,193)	
<i>Estudo 3: Vacinação primária a 6-10-14 semanas com reforço a 15-19 meses</i>				
Pós-primária	DTPw-HBV-Hib _{2,5}	25	0,085 (0,070-0,103)	0,2398
	DTPw-HBV-Hib	25	0,069 (0,051-0,094)	
Pós-reforço	DTPw-HBV-Hib _{2,5}	25	0,207 (0,167-0,258)	0,0744
	DTPw-HBV-Hib	25	0,283 (0,214-0,374)	

Amostras de sangue coletadas um mês após a série primária de 3 doses e antes e 4-6 semanas após a dose de reforço N: Número de indivíduos testados; NS: sem diferença estatística; CI de 95%: intervalo de confiança de 95%; GMAI: índice de avidéz por média geométrica; *OmniHIB™; HBV - vacina contra hepatite B DTPw-HBV/ Hib_{2,5}: vacina contra Hib contendo 2,5 pg de PRP conjugado a TT. Estudo 1: Alemanha, 20-08-1993 a 28-08-1995. Estudo 2: EUA, 24-07-1996 a 28-04-1998. Estudo 3: Myanmar, 16-01-1998 a 11-10-1999. † p-valor bi-lateral usando teste ANOVA unidirecional para mostrar uma diferença entre grupos

Tabela 5: Efeito de IPV na redução de interferência sobre a resposta a Hib após co-administração de MenC-CRM1197 e Hib-TT para vacinação primária a 2, 3 e 4 meses de idade

	Alemanha				Reino Unido			
	N	≥ 0,15 µg/ml %	GMC (CI 95%)	Ref de	N	≥ 0,15 µg/ml %	GMC (CI de 95%)	Ref
Vacina								
DTPa3-Hib	387	96,4	2,022 (1,766; 2,316)	[60]	103	96,0	1,56 (1,19; 2,04)	*
DTPa-Hib + MenC-CRM197†	----- Sem dados -----				40	82,5	0,542 (0,343; 0,858)	**
DTPa3-HBV-IPV-Hib	145	99,3	2,62 (2,1; 3,2)	[66]	----- Sem dados -----			
DTPa-HBV-IPV-Hib + MenC-CRM197†	105	97,1	2,78 (2,11; 3,65)	[67]	----- Sem dados -----			

*Dados anteriormente não publicados de Dr IG Jones, **dados anteriormente não publicados, † Meningitec™

Exemplo 2

Um estudo foi realizado para investigar a resposta imune a PRP em Hib quando de co-administração de Infanrix-Hexa com diferentes vacinas de conjugado pneumocócico contendo diferentes quantidades de TT, conforme detalhado na Tabela 6 abaixo.

- Design experimental: estudo cego, aleatório, multi-centro com II grupos paralelos (60 indivíduos por grupo); todos os grupos receberam um curso de vacinação primária com três doses.

- Nove grupos receberam, cada um, uma formulação diferente das vacinas Pn-PD-DiT candidatas com doses de cada polissacarídeo conforme mostrado na Tabela 6. Além disso, um grupo recebeu a vacina 11Pn-PD de primeira geração (como comparador) e um grupo recebeu Prevenar® (como controle). Todos os grupos também receberam uma injeção concomitante de vacina DTPa-HBV-IPV/Hib.

- Às cegas: às cegas, contudo, os nove grupos com 11 Pn-PD-DiT foram duplamente às cegas.

- Comparador: 11Pn-PD + DTPa-HBV-IPV/Hib

- Controle: Prevenar + DTPa-HBV-IPV/Hib

- Esquema de vacinação: curso de vacinação primária com três doses foi fornecido a bebês, de acordo com um esquema de 2-3-4 meses. A primeira dose do curso de vacinação com três doses foi fornecida entre 8 e 16 semanas (56-118 dias) de idade, com intervalos permitidos entre as doses de vacinação primária de 28-42 dias.

- Acompanhamento de oito dias dos sintomas locais e gerais esperados e acompanhamento de 31 dias para eventos adversos não esperados após cada dose de vacina. Eventos adversos graves foram registrados durante todo o período de estudo.

- Duas amostras de sangue:

- imediatamente antes da 1ª dose (4 mL foram tomados).

- 1 mês após a 3ª dose (4 mL foram tomados).

- Duração do estudo: aproximadamente 6 meses, com um período de arrolamento de 3 meses.

5 Para cada indivíduo, a duração do estudo foi de aproximadamente 3 meses.

Tabela 6: Dosagem de polissacarídeo e proteína veículo para cada sorotipo em formulações de HPn-PD-DiT e N° de lote

	Dose 6B PS	Dose 18C PS	Dose 23F PS	Dose 19F PS	Dose 1,3,4,5, 7F, 9V e 14 PS	PD livre	Dose total de TT	Número de conjugad os sobre TT	Dose total de TT em HPn- PD-DiT
Forma A	1 µg TTAH	3 µg DTAH	1 µg PD	3 µg DT	1 µg PD	-	63 µg	1	3 µg
Forma B	1 µg TTAH	1 µg TTAH	1 µg PD	3 µg DT	1 µg PD	-	66 µg	2	6 µg
Forma C	1 µg TTAH	3 µg DTAH	1 µg TTAH	3 µg DT	1 µg PD	-	66 µg	2	6 µg
Forma D	1 µg TTAH	1 µg TTAH	1 µg TTAH	3 µg DT	1 µg PD	-	69 µg	3	9 µg
Forma E	3 µg TTAH	1 µg TTAH	1 µg TTAH	3 µg DT	1 µg PD	-	75 µg	3	15 µg
Forma F	1 µg TTAH	3 µg TTAH	1 µg TTAH	3 µg DT	1 µg PD	-	75 µg	3	15 µg
Forma G	1 µg TTAH	1 µg TTAH	3 µg TTAH	3 µg DT	1 µg PD	-	75 µg	3	15 µg
Forma H	3 µg TTAH	1 µg TTAH	3 µg TTAH	3 µg DT	1 µg PD	-	81 µg	3	21 µg
Forma I	1 µg TTAH	1 µg TTAH	1 µg TTAH	3 µg DT	1 µg PD	5 µg	69 µg	3	9 µg

Notas: TTAH: toxóide do tétano com espaçador AH, DTAH: toxóide de difteria com espaçador AH, PD: proteína D de H. influenzae; AH: dihidrazida adípica

10 A Tabela 7 mostra as taxas de soroproteção e GMCs para anticorpos contra o antígeno PRP de polissacarídeo Hib, um mês após a dose III pós-vacinação. Um mês após a terceira dose de vacina, todos os indivíduos em alguns grupos, com exceção de 1 indivíduo no grupo com Prevenar® (Wyeth), atingiram concentrações soroprotetoras de anticorpo $\geq 0,15$ µg/ml e

15 pelo menos 83,9% dos indivíduos que receberam as formulações de HPn-PD-DiT atingiram uma concentração soroprotetora de anticorpo ≥ 1 µg/ml. As GMCs anti-PRP observadas para formulações de HPn-PD-DiT são maiores do que aquelas observadas para HPn-PD (todos os 11 polissacarídeos conjugados à Proteína D) e grupos com Prevenar®.

Tabela 7: Taxas de soroproteção e GMCs para anticorpos anti-PRN (grupo total vacinado)

			≥ 0,15 µg/ml					≥ 1 µg/ml				GMC		
			CI de 95%					CI de 95%				CI de 95%		
Anticorpo	Grupo	Momento	N	n	%	LL	UL	n	%	LL	UL	valor	LL	UL
ANTI-PRP	11Pn-PD	PIII(M3)	58	58	100	93,8	100	40	69,0	55,5	80,5	1,943	1,417	2,665
	DiTF_A	PIII(M3)	57	57	100	93,7	100	48	84,2	72,1	92,5	3,811	2,793	5,200
	DiTF_B	PIII(M3)	64	64	100	94,4	100	58	90,6	80,7	96,5	4,010	3,051	5,270
	DiTF_C	PIII(M3)	58	58	100	93,8	100	52	89,7	78,8	96,1	4,082	3,050	5,465
	DiTF_D	PIII(M3)	60	60	100	94,0	100	51	85,0	73,4	92,9	4,167	3,035	5,721
	DiTF_E	PIII(M3)	56	56	100	93,6	100	52	92,9	82,7	98,0	5,352	3,954	7,244
	DiTF_F	PIII(M3)	62	62	100	94,2	100	52	83,9	72,3	92,0	3,989	2,905	5,478
	DiTF_G	PIII(M3)	58	58	100	93,8	100	50	86,2	74,6	93,9	4,660	3,324	6,535
	DiTF_H	PIII(M3)	62	62	100	94,2	100	53	85,5	74,2	93,1	4,030	3,033	5,354
	DiTF_I	PIII(M3)	65	65	100	94,5	100	61	93,8	85,0	98,3	5,679	4,223	7,638
	Prevenar	PIII(M3)	60	59	98,3	91,1	100	45	75,0	62,1	85,3	2,145	1,546	2,975

GMC = concentração de anticorpo por média geométrica calculada para todos os indivíduos

5 N = número de indivíduos com resultados disponíveis

n/% = número/percentual de indivíduos com concentração dentro da faixa especificada

CI de 95% = intervalo de confiança de 95%; LL = Limite mínimo, UL = limite máximo

MIN/MAX = Mínimo/Máximo

PIII(M3) = Um mês após terceira dose de vacina

10 Anteriormente, a vacina 11 valente descrita no EP983087 onde 7 sacarídeos foram conjugados a TT teve um desempenho desapontador quando fornecida ao mesmo tempo que DTPa (GAVI Immunisation Focus, Março de 2002, página 4).

Os presentes inventores mostraram que há uma correlação de GMC anti-PRP aumentada e TT aumentada na vacina de conjugado pneumocócico até 3-4 conjugados estão sobre TT, quando a GMC começa a cair. Portanto, está claro que a incorporação da pequena quantidade co-administrada de TT leva à respostas imunes aprimoradas a Hib PRP-TT.

Exemplo 3

20 Estudo aleatório, fase II, duplamente cego, controlado para avaliar a praticabilidade de uma dose ao nascimento de vacina contra pertussis acelular (Pa) da GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals administrada

tão logo o nascimento, seguido por vacinação primária com 3 doses de Infanrix hexa™ da GSK Biologicals em aceleração ao desenvolvimento de uma resposta imune contra pertussis. Vacinação primária é acompanhada no segundo ano de vida por uma dose de reforço de Infanrix hexa™.

5 **Design de estudo:** Estudo duplamente cego, aleatório (1:1), auto-contido em um único centro conduzido na Alemanha com 2 grupos paralelos:

- o **Grupo com Pa ao nascimento** recebeu uma dose de vacina contra pertussis acelular (Pa) com tri-componentes ao nascimento (compreendendo 25 µg de toxóide de pertussis (PT), 25 µg de hemaglutinina
10 filamentosa (FHA) e 8 µg de pertactina (PRN))

- o **Grupo com Hep B ao nascimento** recebeu uma dose de vacina contra hepatite B ao nascimento.

A 2, 4 e 6 meses de idade, ambos os grupos receberam vacina Infanrix hexa™ da GSK Biologicals (DTPa-HBV-IPV/Hib).

15 Um total de quatro amostras de sangue foi extraído nos seguintes pontos de tempo no estudo: antes da dose de Pa ou HBV ao nascimento (pré-dose 1), um mês após a primeira dose, um mês após a segunda dose e um mês após a terceira dose de vacina DTPa-HBV-IPV/Hib (respectivamente, dose 1 pós-hexa, dose 2 pós-hexa e dose 3 pós-hexa).

20 **Nota:** Nesse estudo, um total de quatro doses da vacina de estudo foi administrado (dose ao nascimento + 3 doses de Infanrix hexa™). Para fins de clareza com relação às doses de vacina, a dose ao nascimento é referida como Dose 1 e os pontos de tempo pós-vacinação com Infanrix hexa™ são referidos como dose 1 pós-hexa, dose 2 pós-hexa e dose 3 pós-hexa.

Número de indivíduos:	Pa no grupo ao nascimento	HepB no grupo ao nascimento	Total
<i>Planejado</i>	60	60	120
<i>Arrolado & vacinado (= grupo total vacinado = grupo de acordo com o protocolo (ATP) para segurança)</i>	60	61	121
<i>Grupo ATP para imunogenicidade:</i>	55	57	112
<i>terminado</i>	54	56	110
Não houve saídas do estudo em virtude de eventos adversos ou eventos adversos graves			

Um objetivo desse estudo exploratório foi avaliar a imunogenicidade e segurança de uma dose de uma vacina Pa administrada tão logo após o nascimento, o qual incluía explorar a imunogenicidade de uma dose ao nascimento de Pa, seguido por três doses de Infanrix hexa™, comparado com um esquema de rotina de três doses de Infanrix hexa™, começando a 2 meses de idade, em termos de todos os antígenos, em cada ponto de tempo, um resultado sorológico estava disponível.

Resultados de imunogenicidade

Anticorpos totais a PRP de polissacarídeo Hib foram medidos através de ELISA. O corte do teste foi de 0,15 µg/ml.

Resposta de anticorpo anti-PRP

As taxas de soroproteção e as GMCs para anticorpos anti-PRP são apresentadas na Tabela 8. Um mês após a 3 dose de hexa, níveis soroprotetores ($\geq 0,15$ µg/ml) de anticorpos anti-PRP foram observados em 88,7% dos indivíduos no Grupo com Pa ao nascimento e 98,2% de indivíduos no Grupo com HepB ao nascimento. Pelo menos 49,1% dos indivíduos em cada group tinham concentrações de anticorpo anti-PRP ≥ 1 µg/ml.

Tabela 8: Taxas de soroproteção e GMCs para anticorpos anti-PRP (grupo ATP para imunogenicidade)

			$\geq 0,15$ µg/ml				≥ 1 µg/ml				GMC		
					CI de 95%				CI de 95%			CI de 95%	
Grupo	Momento	N	n	%	LL	UL	n	%	LL	UL	µg/ml	LL	UL
Pa ao nascimento	PIV(M7)	53	47	88,7	77,0	95,7	26	49,1	35,1	63,2	0,942	0,632	1,403
HepB ao nascimento	PIV(M7)	55	54	98,2	90,3	100	38	69,1	55,2	80,9	2,353	1,585	3,493

Grupo com Pa ao nascimento: recebeu vacina Pa acelular ao nascimento and Infanrix hexa™ a 2, 4, 6 meses de idade

Grupo com HepB ao nascimento: recebeu vacina contra Hepatite B ao nascimento e Infanrix hexa™ a 2, 4, 6 meses de idade

GMC = concentração de anticorpo por média geométrica, calculada para todos os indivíduos. À concentrações de anticorpo abaixo do corte dos ensaios foi fornecido um valor arbitrário de metade do corte para fins de cálculo da GMC

N = número de indivíduos com resultados disponíveis

n/% = número/percentual de indivíduos com concentração dentro da faixa especificada CI de 95% = intervalo de confiança de 95%; LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo

PIV(M7) = amostra de sangue tomada um mês após a terceira dose de Infanrix hexa™

Diferenças nas taxas de soroproteção anti-PRP ($\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ e $\geq 1 \mu\text{g/ml}$) entre o grupo com Pa ao nascimento e o grupo com HepB ao nascimento com seus CI's de 95% assintóticos padronizados um mês após as primeira e segunda doses de Infanrix hexaTM para o corte de $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ são apresentadas na Tabela 9 e Tabela 10 para o corte de $\geq 1 \mu\text{g/ml}$. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo com Pa ao nascimento e o grupo com HepB ao nascimento em termos de taxa de soroproteção para anticorpos anti-PRP ($\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$) nos pontos de tempo dose 1 ou 2 pós-hexa (Tabela 9). O percentual de indivíduos com anticorpos anti-PRP $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ foi estatisticamente menor no grupo com Pa ao nascimento do que no grupo com HBV ao nascimento na dose 2 pós-hexa (Tabela 10).

Tabela 9: Diferenças nas taxas de soroproteção para anticorpos anti-PRP ($\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$) entre o grupo com Pa ao nascimento e o grupo com HepB ao nascimento com seus CI's de 95% assintóticos padronizados um mês após as primeira e segunda doses de Infanrix hexa (grupo ATP para imunogenicidade)

						Diferença nas taxas de soroproteção anti-PRP (Grupo 2 menos Grupo 1)				
								95 % CI		
Grupo 1	N	%	Grupo 2	N	%	Diferença	%	LL	UL	P-valor
A PII(M3)										
Pa ao nascimento	53	39,6	HepB ao nascimento	56	46,4	HepB ao nascimento - Pa ao nascimento	6,81	-11,70	24,81	0,562
A PIII(M5)										
Pa ao nascimento	51	70,6	HepB ao nascimento	52	80,8	HepB ao nascimento - Pa ao nascimento	10,18	-6,48	26,60	0,257

Grupo com Pa ao nascimento: recebeu vacina Pa acelular ao nascimento and Infanrix hexaTM a 2, 4, 6 meses de idade

Grupo com HepB ao nascimento: recebeu vacina contra Hepatite B ao nascimento e Infanrix hexaTM a 2, 4, 6 meses de idade

PII(M3) = amostra de sangue tomada um mês após a primeira dose de Infanrix hexaTM

PIII(M5) = amostra de sangue tomada um mês após a segunda dose de Infanrix hexaTM

N = número de indivíduos com resultados disponíveis

% = percentual de indivíduos com concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ CI de 95% = intervalo de confiança assintótico padronizado; LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo

p-valor = Teste Exato de Fisher Bi-lateral

Tabela 10: Diferenças nas taxas de soroproteção para anticorpos anti-PRP ($\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$) entre o grupo com Pa ao nascimento e o grupo com HepB ao nascimento com seus CI's de 95% assintóticos padronizados um mês após as

primeira e segunda doses de Infanrix hexa (grupo ATP para imunogenicidade)

						Diferença nas taxas de soroproteção anti-PRP (Grupo 2 menos Grupo 1)				
						95 % CI				
Grupo 1	N	%	Grupo 2	N	%	Diferença	%	LL	UL	P-valor
A PII(M3)										
Pa ao nascimento	53	5,7	HepB ao nascimento	56	10,7	HepB ao nascimento - Pa ao nascimento	5,05	-6,14	16,69	0,490
A PIII(M5)										
Pa ao nascimento	51	15,7	HepB ao nascimento	52	40,4	HepB ao nascimento - Pa ao nascimento	24,70	7,54	40,78	0,008

Grupo com Pa ao nascimento: recebeu vacina Pa acelular ao nascimento and Infanrix hexa™ a 2, 4, 6 meses de idade

Grupo com HepB ao nascimento: recebeu vacina contra Hepatite B ao nascimento e Infanrix hexa™ a 2, 4, 6 meses de idade

PII(M3) = amostra de sangue tomada um mês após a primeira dose de Infanrix hexa™

PIII(M5) = amostra de sangue tomada um mês após a segunda dose de Infanrix hexa™

N = número de indivíduos com resultados disponíveis

% = percentual de indivíduos com concentrações de anticorpo anti-PRP $\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$ CI de

95% = intervalo de confiança assintótico padronizado; LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo

p-valor = Teste Exato de Fisher Bi-lateral

As proporções de GMC um mês após as primeira e segunda doses de Infanrix hexa™ para o grupo com Pa ao nascimento e o grupo com HepB ao nascimento com CI de 95% são apresentadas na Tabela 11. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo com Pa ao nascimento e o grupo com HepB ao nascimento para GMCs de anticorpos anti-PRP na dose 1 pós-hexa.

Na dose 2 pós-hexa, GMCs de anticorpos contra PRP eram significativamente menores no grupo com Pa ao nascimento do que no grupo com HBV ao nascimento.

Tabela 11: Proporções de GMC anti-PRP um mês após as primeira e segunda doses de Infanrix hexa para o grupo com Pa ao nascimento e o grupo com HepB ao nascimento com CIs de 95% (grupo ATP para imunogenicidade)

						Diferença nas taxas de soroproteção anti-PRP (Grupo 2 menos Grupo 1)				
						95 % CI				
Grupo	N	GMC	Grupo	N	GMC	Proporção	Valor	LL	UL	
A PII(M3)										
Pa ao nascimento	53	0,146	HepB ao nascimento	56	0,183	HepB ao nascimento - Pa ao nascimento	0,8	0,5	1,2	
A PIII(M5)										
Pa ao nascimento	51	0,304	HepB ao nascimento	52	0,771	HepB ao nascimento - Pa ao nascimento	0,4	0,2	0,7	

Grupo com Pa ao nascimento: recebeu vacina Pa acelular ao nascimento and Infanrix

hexa™ a 2, 4, 6 meses de idade

Grupo com HepB ao nascimento: recebeu vacina contra Hepatite B ao nascimento e Infanrix hexa™ a 2, 4, 6 meses de idade

PII(M3) = amostra de sangue tomada um mês após a primeira dose de Infanrix hexa™

5 PIII(M5) = amostra de sangue tomada um mês após a segunda dose de Infanrix hexa™

GMC = concentração de anticorpo por média geométrica calculada sobre todos os indivíduos número de indivíduos com resultados disponíveis

CI de 95% = intervalo de confiança de 95% para a proporção de GMC (modelo ANOVA - variância acumulada); LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo

10 A resposta imune ao componente Hib (PRP conjugado a toxóide do tétano) da vacina primária foi significativamente reduzida nos recipientes da vacina Pa ao nascimento. Também, a GMC de anticorpo anti-tétano foi significativamente menor do grupo com Pa ao nascimento, embora as taxas de soroproteção fossem idênticas (100%) nos dois grupos. Os

15 mecanismos que fundamentam esse efeito são desconhecidos, embora ele possa ser em virtude de interferência de vizinhança causada pela Pa ao nascimento a PRP-TT durante imunização primária em combinação com Pa. O fato de que a dose de vacina Pa ao nascimento e a vacina DTPa-HBV-IPV/Hib foram administradas na mesma coxa pode ter exercido um papel.

20 RCCs para as concentrações de anticorpo anti-PRP um mês após a terceira dose de Infanrix hexa™ são apresentadas na Figura 3.

Resultados de imunogenicidade a partir do estudo com reforço

Tabela 12: Taxas de soroproteção e GMCs para anticorpos anti-PRP (grupo ATP para imunogenicidade)

				≥ 0,15 µg/ML				≥ 1 µg/ML				GMC		
				CI de 95%				CI de 95%				CI de 95%		
Anticorpo	Grupo	Momento	N	n	%	LL	UL	n	%	LL	UL	valor	LL	UL
ANTI-PRP	Pa	PIV(M0)	29	17	58,6	38,9	76,5	0	0,0	0,0	11,9	0,200	0,139	0,286
		PV(M1)	29	29	100	88,1	100	25	86,2	68,3	96,1	8,400	4,473	15,775
	HepB	PIV(M0)	33	25	75,8	57,7	88,9	9	27,3	13,3	45,5	0,448	0,274	0,732
		PV(M1)	35	35	100	90,0	100	35	100	90,0	100	22,911	15,287	34,336

25 1. Pa = Pa ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço

2. HepB = HBV ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço

3. soroproteção = concentração de anticorpo anti-PRP ≥ 0,15 UG/ML

4. GMC = concentração de anticorpo por média geométrica calculada sobre todos os indivíduos

30 5. N = número de indivíduos com resultados disponíveis

6. n/% = número/percentual de indivíduos com concentração dentro da faixa especificada
 7. CI de 95% = intervalo de confiança de 95%; LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo
 8. PIV(M0) = Pré-reforço
 9. PV(M1) = um mês pós-reforço

5 **Tabela 13:** Diferença entre grupos quanto à taxa de soroproteção anti-PRP no pré-reforço (grupo ATP para imunogenicidade)

						Diferença na taxa de soroproteção (Grupo 2 menos grupo 1)				
								CI de 95%		
Grupo 1	N	%	Grupo 2	N	%	Diferença	%	LL	UL	p-valor
Pa	29	58,6	HepB	33	75,8	HepB-Pa	17,14	-6,17	39,26	0,181

1. Pa = Pa ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço

2. HepB = HBV ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço

3. N = número de indivíduos com resultados disponíveis

10 4. % = percentual de indivíduos com concentração anti-PRP $\geq 0,15$ UG/ML

5. CI de 95% = intervalo de confiança assintótico padronizado de 95%; LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo

6. P-valor = Teste exato de Fisher bi-lateral

Tabela 14: Diferença entre grupos na concentração de anticorpo anti-PRP ≥ 1

15 UG/ML no pré-reforço (grupo ATP para imunogenicidade)

						Diferença na concentração de anticorpo ANTI-PRP ≥ 1 UG/ML (Grupo 2 menos grupo 1)				
								CI de 95%		
Grupo 1	N	%	Grupo 2	N	%	Diferença	%	LL	UL	p-valor
Pa	29	0,0	HepB	33	27,3	HepB-Pa	27,27	14,21	44,22	0,002

1. Pa = Pa ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço

2. HepB = HBV ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço

3. N = número de indivíduos com resultados disponíveis

4. % = percentual de indivíduos com concentração anti-PRP $\geq 0,1$ UG/ML

20 5. CI de 95% = intervalo de confiança assintótico padronizado de 95%; LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo

6. P-valor = Teste exato de Fisher bi-lateral

Tabela 16: Diferença entre grupos na concentração de anticorpo anti-PRP ≥ 1 UG/ML em um mês pós-reforço (grupo ATP para imunogenicidade)

25

						Diferença na concentração de anticorpo ANTI-PRP ≥ 1 UG/ML (Grupo 2 menos grupo 1)				
								CI de 95%		
Grupo 1	N	%	Grupo 2	N	%	Diferença	%	LL	UL	p-valor
Pa	29	86,2	HepB	35	100	HepB-Pa	13,79	3,17	30,56	0,037

1. Pa = Pa ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço

2. HepB = HBV ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço

3. N = número de indivíduos com resultados disponíveis
 4. % = percentual de indivíduos com concentração anti-PRP $\geq 0,1$ UG/ML
 5. CI de 95% = intervalo de confiança assintótico padronizado de 95%; LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo
 5 6. P-valor = Teste exato de Fisher bi-lateral

Tabela 17: Proporções de GMCs anti-PRP a um mês pós-reforço (grupo ATP para imunogenicidade)

				Proporção GMC (Pa/HepB)		
Pa		HepB			CI de 95%	
N	GMC	N	GMC	Valor	LL	UL
29	8,400	35	22,911	0,37	0,18	0,75

1. Pa = Pa ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço
 2. HepB = HBV ao nascimento e DTPa-HBV-IPV/Hib a 2-4-6 meses e reforço
 10 3. GMC = concentração de anticorpo por média geométrica
 4. N = número de indivíduos com resultados disponíveis
 5. CI de 95% = intervalo de confiança de 95% para a proporção GMC (modelo ANOVA - variância acumulada); LL = Limite mínimo, UL = Limite máximo

REIVINDICAÇÕES

1. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos nove conjugados de sacarídeo, em que entre dois e sete conjugados de sacarídeo inclusive são conjugados à proteína carreadora CRM, o referido kit sendo adequado para uso em um esquema de imunização primária, o referido kit compreendendo:

um primeiro recipiente compreendendo:

a) um conjugado de sacarídeo Hib na presença de CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT, mas o qual não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

b) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo conjugado a CRM; e

c) opcionalmente pelo menos um outro conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT,

e um segundo recipiente compreendendo:

d) pelo menos um conjugado de sacarídeo conjugado a CRM;

e) opcionalmente pelo menos um outro conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT,

e, opcionalmente, um terceiro recipiente compreendendo opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo, em que:

f) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo é conjugado a CRM;

g) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT.

2. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos sete conjugados de sacarídeo em que entre dois e seis conjugados de sacarídeo inclusive são conjugados à proteína carreadora CRM, o referido kit sendo adequado para uso em um esquema de imunização primária, o referido kit compreendendo:

um primeiro recipiente compreendendo:

a) HB na presença de CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT, opcionalmente adsorvido sobre fosfato de alumínio;

5 b) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo conjugado a CRM; e

c) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

e um segundo recipiente compreendendo:

d) pelo menos um conjugado de sacarídeo conjugado a CRM;

10 e) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT,

e, opcionalmente, um terceiro recipiente opcionalmente compreendendo pelo menos um conjugado de sacarídeo em que:

15 f) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo é conjugado a CRM;

g) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT.

3. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos oito conjugados de sacarídeo conjugados à proteína carreadora CRM, adequado para uso em um esquema de imunização primária, o referido kit
20 compreendendo:

um primeiro recipiente compreendendo:

a) um antígeno sensível (tais como: conjugado de sacarídeo Hib, não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT; e/ou HB, opcionalmente adsorvido sobre fosfato de alumínio) não na presença de CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT; e
25

b) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT,

e um segundo recipiente compreendendo:

c) pelo menos sete, oito, dez, onze ou treze conjugados de sacarídeo conjugado a CRM;

d) opcionalmente pelo menos um outro conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT

5 e opcionalmente um terceiro recipiente compreendendo opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo em que:

e) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo é conjugado a CRM;

10 f) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT.

4. Kit de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o antígeno de superfície HB está presente em uma dose de aproximadamente 2,5 µg de sacarídeo.

15 5. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende sete ou mais conjugados de sacarídeo em que menos do que sete conjugados de sacarídeo são conjugados à proteína carreadora CRM, o referido kit sendo adequado para uso em um esquema de imunização primária, o referido kit compreendendo:

um primeiro recipiente compreendendo:

20 a) um conjugado de sacarídeo Hib não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

b) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT,

e um segundo recipiente compreendendo:

25 c) menos do que sete sacarídeos conjugados a CRM,

e, opcionalmente, um terceiro recipiente compreendendo:

d) opcionalmente pelo menos um conjugado de sacarídeo não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT.

6. Vacina combinada adequada para imunização primária

caracterizada pelo fato de compreender nove ou mais conjugados de sacarídeo:

a) em que o conjugado de sacarídeo Hib está presente, mas não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

5 b) em que entre dois e sete conjugados de sacarídeo inclusive são conjugados a CRM;

c) em que um ou mais de outro conjugado de sacarídeo não são conjugados a CRM.

10 7. Kit de acordo com a reivindicação 1 ou vacina combinada de acordo com a reivindicação 6, caracterizado(a) pelo fato de que a dose média de CRM por conjugado de sacarídeo CRM-conjugado presente no kit ou na vacina combinada é de 1-15 µg, 1-10 µg, 1-5 µg ou 1-3 µg.

15 8. Kit ou vacina combinada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 6 ou 7, caracterizado(a) pelo fato de que a carga total de CRM no kit ou na vacina combinada é menor do que 35 µg, por exemplo, 2-30 µg, 5-25 µg ou 10-20 µg.

20 9. Kit ou vacina combinada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 6, 7 ou 8, caracterizado(a) pelo fato de que o conjugado de sacarídeo Hib está presente em uma dose de 1-15, 2-10, 3-8 ou 4-6 µg de sacarídeo, por exemplo, aproximadamente 10 µg de sacarídeo.

10. Vacina combinada adequada para imunização primária caracterizada pelo fato de compreender sete ou mais sacarídeos:

a) em que HB está presente;

25 b) em que entre dois e seis conjugados de sacarídeo inclusive são conjugados a CRM;

c) em que um ou mais de outros conjugados de sacarídeo não são conjugados a CRM.

11. Kit de acordo com a reivindicação 2 ou vacina combinada de acordo com a reivindicação 10, caracterizado(a) pelo fato de que a dose

média de CRM por conjugado de sacarídeo CRM-conjugado presente no kit ou na vacina combinada é de 1-9 µg, 1-6 µg, 1-5 µg ou 1-3 µg.

12. Kit ou vacina combinada de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 10 e 11, caracterizado(a) pelo fato de que a carga total de CRM no kit ou na vacina combinada é menor do que 20 µg, por exemplo, 2-18 µg ou 5-15 µg.

13. Kit ou vacina combinada de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 10, 11 e 12, caracterizado(a) pelo fato de que o antígeno de superfície HB está adsorvido sobre fosfato de alumínio e está opcionalmente presente em uma dose de aproximadamente 10 µg.

14. Método de diminuição da interferência de vizinhança de CRM sobre um antígeno sensível em um esquema de imunização primária de uma vacina, caracterizado pelo fato de compreender uma ou mais das seguintes etapas:

15 a) diminuição da quantidade de CRM e/ou número de conjugados a CRM na vacina;

b) inclusão de IPV na vacina compreendendo o antígeno sensível;

20 c) inclusão de Pw na vacina compreendendo o antígeno sensível;

d) diminuição da dose de DT na vacina compreendendo o antígeno sensível;

e) aumento da dose do antígeno sensível;

25 f) se Pa está presente na vacina compreendendo antígeno sensível, redução da dose de Pa ou número de componentes de Pa;

g) remoção de CRM da vacina compreendendo o antígeno sensível ou remoção de CRM totalmente do kit ou remoção de CRM, DT e derivados de DT da vacina compreendendo o antígeno sensível.

15. Método de diminuição da interferência de vizinhança sobre

um antígeno sensível quando do uso de um kit compreendendo oito ou mais conjugados de sacarídeo conjugados a CRM, caracterizado pelo fato de compreender

um primeiro recipiente compreendendo:

- 5 a) um antígeno sensível ou antígenos sensíveis na presença de CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

e um segundo recipiente compreendendo:

- b) sete ou mais conjugados de sacarídeo conjugados a CRM;
c) opcionalmente pelo menos um outro conjugado de sacarídeo
10 não conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;

e opcionalmente um terceiro recipiente opcionalmente compreendendo pelo menos um conjugado de sacarídeo o qual é:

- d) opcionalmente conjugado a CRM;
e) opcionalmente não conjugado a CRM
15 compreendendo a etapa de remoção de todo CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT do recipiente compreendendo o antígeno sensível ou redução do número de conjugados de sacarídeo conjugados a CRM para não mais do que sete.

16. Uso de conjugados de sacarídeo, caracterizado pelo fato de
20 ser para a preparação de um kit ou combinação de vacina como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 13 para imunização contra doença causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da Hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*, em que:

- 25 a) cada antígeno no kit ou na vacina combinada é para administração 2-3 vezes em um esquema de imunização primária;
b) Hib não é conjugado a CRM, DT ou qualquer outro derivado de DT;
c) existem 7 ou mais conjugados de antígenos de sacarídeo

capsular de *Streptococcus pneumonia*;

d) o número de antígenos de sacarídeo capsular de *Streptococcus pneumonia* e *Neisseria meningitidis* conjugado a CRM é menor do que 8.

- 5 17. Kit, vacina combinada, método ou uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizados pelo fato de que CRM é CRM-197.

FIGURA 1

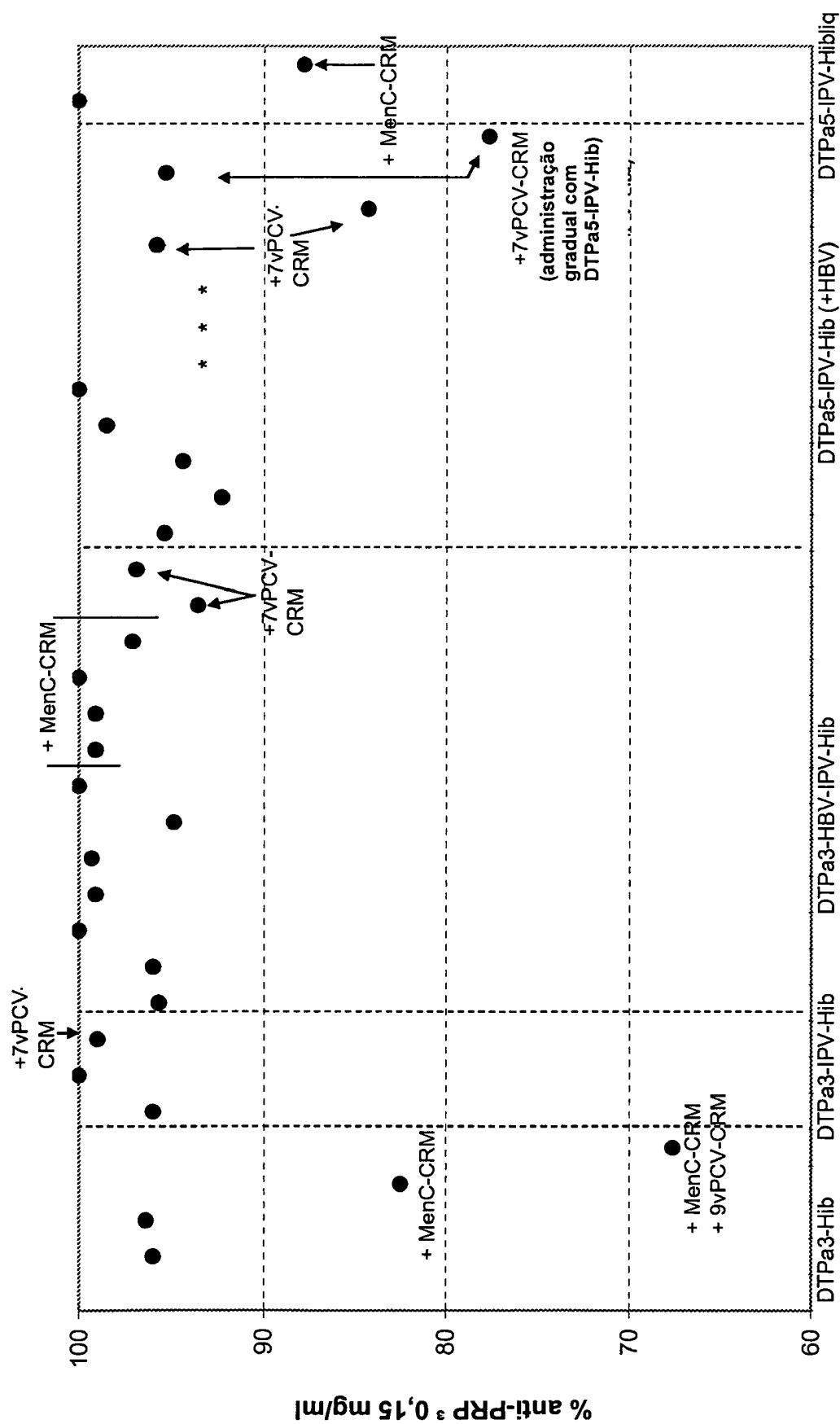


FIGURA 2

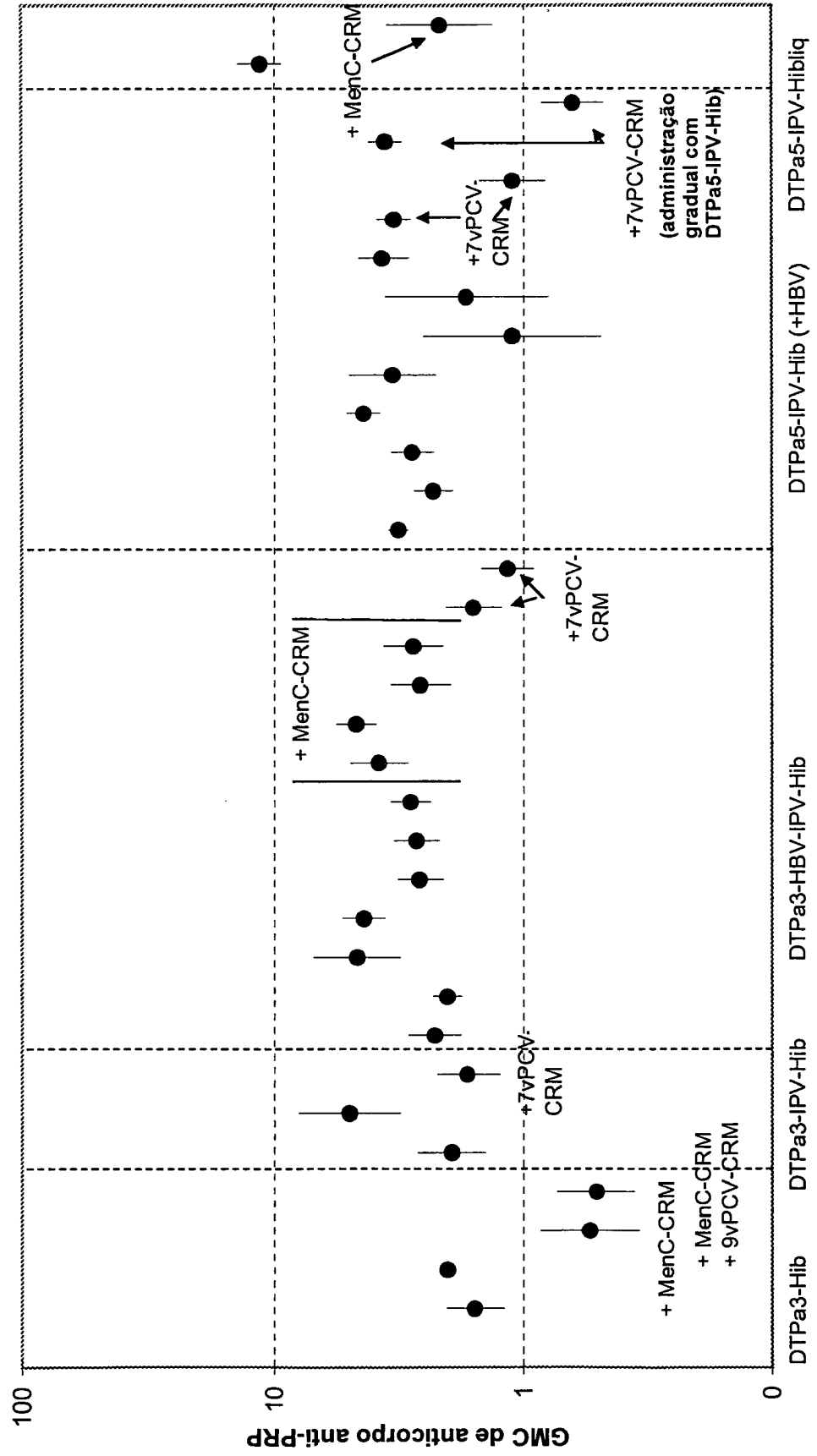
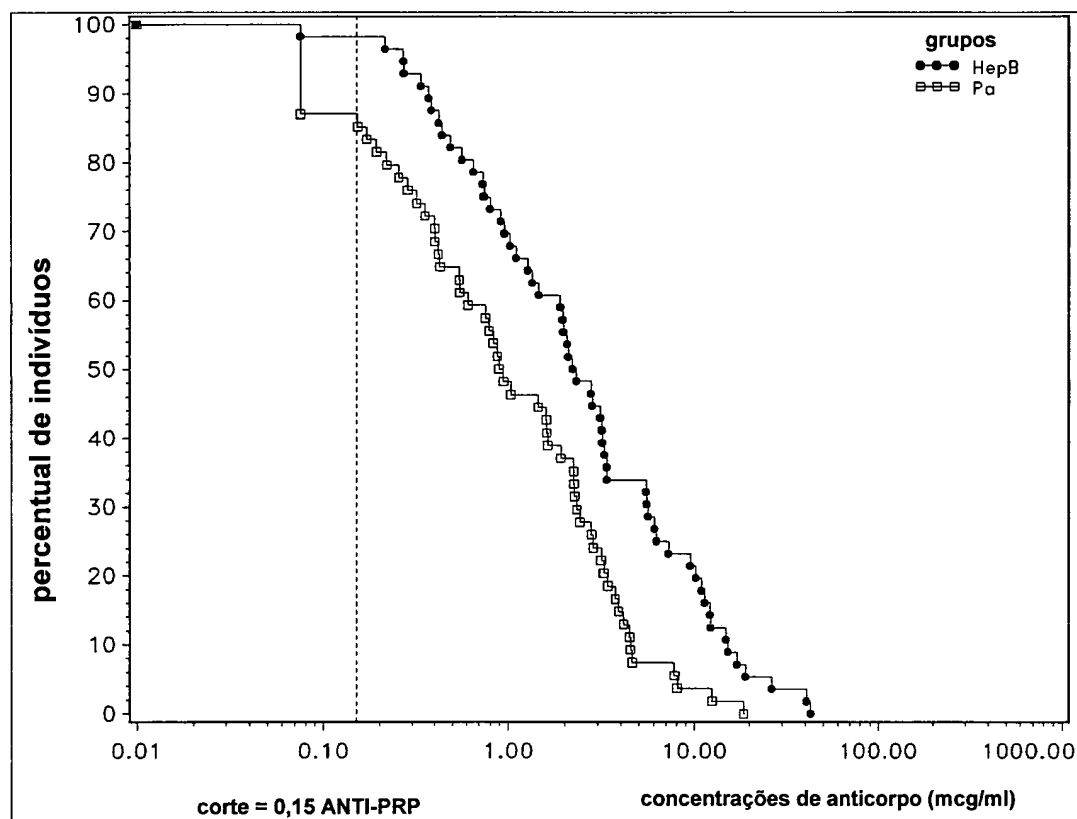


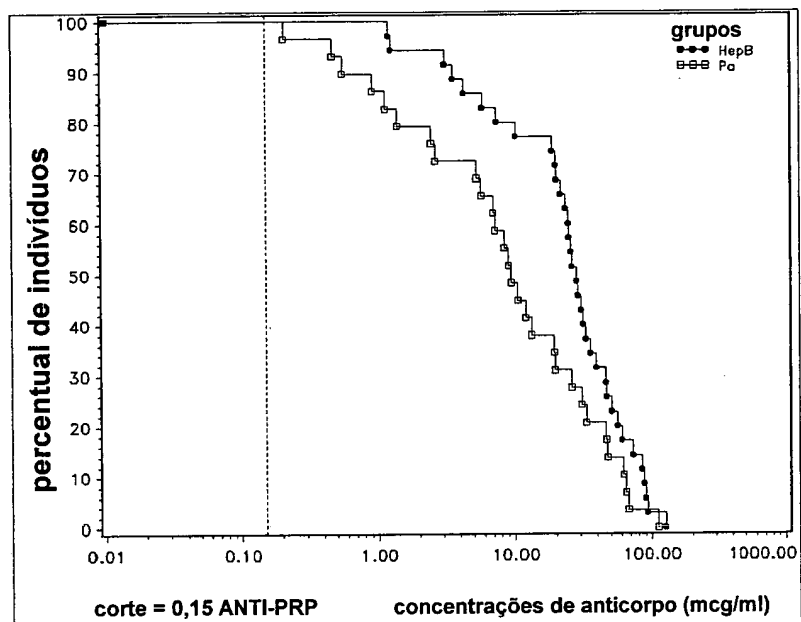
FIGURA 3 - Curvas cumulativas reversas para concentrações de anticorpo anti-PRP um mês após a terceira dose de vacina Infanrix Hexa (grupo ATP para imunogenicidade)



Grupo com HepB ao nascimento: recebeu vacina contra Hepatite B ao nascimento e Infanrix hexaÔ a 2, 4, 6 meses de idade

Grupo com Pa ao nascimento: recebeu vacina de Pa acelular ao nascimento e Infanrix hexaÔ a 2, 4, 6 meses de idade

FIGURA 4 - Curvas cumulativas reversas para concentrações de anticorpo anti-PRP um mês após a dose de vacina de reforço de Infanrix Hexa (grupo ATP para imunogenicidade)



RESUMO

“KIT, VACINA COMBINADA, E, MÉTODOS DE DIMINUIÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE VIZINHANÇA DE CRM SOBRE UM ANTÍGENO SENSÍVEL EM UM ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO PRIMÁRIA DE UMA VACINA, E DE DIMINUIÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE VIZINHANÇA SOBRE UM ANTÍGENO SENSÍVEL, E, USO DE CONJUGADOS DE SACARÍDEO”

A presente invenção se refere ao campo de vacina e, em particular, à vacinas combinadas e esquemas de co-administração. Os presentes inventores divulgam que uso excessivo de CRM em vacinas pediátricas pode resultar em interferência imune associada a determinados antígenos e fornece soluções para esse problema.