



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

(21) PI 0716518-8 A2



* B R P I 0 7 1 6 5 1 8 A 2 *

(62) Data de Depósito do Pedido Original:
PI0109685 - 23/03/2001

(22) Data de Depósito: 07/09/2007

(43) Data da Publicação: 08/10/2013
(RPI 2231)

(51) Int.Cl.:

A61K 39/13

(54) Título: VACINA, MÉTODO PARA PREVENIR OU TRATAR INFECÇÃO, E, USO DE UMA VACINA

(30) Prioridade Unionista: 07/09/2006 GB 0617602.8,
21/12/2006 GB 0625593.9

(73) Titular(es): Glaxosmithkline Biologicals S.A.

(72) Inventor(es): Anne Mary, Herve De Hemptinne, Marc Sonveaux, Michel Duchene

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007059390 de
07/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/028956de
13/03/2008

(57) Resumo: "SISTEMA E MÉTODO DE FUMO ELÉTRICO". Um sistema de fumo elétrico (21) compreendendo um cigarro (23) e um acendedor elétrico (25), no qual o cigarro (23) compreende uma superfície fosca de tabaco tubular (66) parcialmente cheia com material de tabaco (80) de modo a definir uma porção de barra de tabaco cheia (60) e uma porção de barra de tabaco vaga (90). O cigarro (23) e o acendedor (25) são mutuamente dispostos de modo que quando o cigarro (23) é recebido no acendedor (25), o elemento do aquecedor elétrico (37) do acendedor (25) pelo menos parcialmente sobrepe pelo menos uma porção da porção da barra de tabaco cheia (60). O cigarro (23) e o acendedor (25) são também mutuamente dispostos de modo que quando o cigarro (23) é recebido no acendedor (25), a extremidade livre (15) do cigarro (23) fica fechada. O cigarro (23) inclui uma zona de perfurações (12,14) em uma localização ao longo da porção da barra de tabaco cheia (60), com o cigarro sendo isento de perfurações ao longo da porção da barra de tabaco vaga (90).

“VACINA, MÉTODO PARA PREVENIR OU TRATAR INFECÇÃO, E, USO DE UMA VACINA”

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção diz respeito ao campo de vacinas para proteger contra a pólio, e em particular às vacinas de combinação para proteger contra as doenças da pólio, difteria, tétano e coqueluche.

FUNDAMENTOS

10 As vacinas de combinação (que fornecem proteção contra patógenos múltiplos) são muito desejáveis de modo a minimizar o número de imunizações requeridas para conferir proteção contra patógenos múltiplos, para baratear os custos de administração e para aumentar as taxas de aceitação e cobertura. O fenômeno bem documentado de competição antigênica (ou interferência) complica o desenvolvimento de vacinas de componente múltiplo. A interferência antigênica refere-se à
15 observação de que administrar antígenos múltiplos frequentemente resulta em uma resposta diminuída a certos antígenos em relação à resposta imune observada quando tais antígenos são administrados individualmente.

20 As vacinas de combinação são conhecidas que podem prevenir Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae e opcionalmente poliovírus inativados (IPV), e/ou vírus da Hepatite B e/ou infecção tipo B de Haemophilus (ver por exemplo a WO 93/24148, WO97/00697 e WO2000/030678).

25 Depois de muitos anos de pesquisa a dose padrão de vacinas da pólio aceitas como eficazes dentro da comunidade de vacina presentemente contém 40 unidades de antígeno D de poliovírus inativados tipo 1 (Mahoney), 8 unidades de antígeno D de poliovírus inativados tipo 2 (MEF-1) e 32 unidades de antígeno D de poliovírus inativados tipo 3 (Saukett) (por exemplo, Infanrix-IPV®).

Os presentes inventores surpreendentemente descobriram que doses reduzidas de IPV podem manter um nível adequado ou melhorado de proteção contra a pólio. Tais vacinas carregam vantagens consideráveis incluindo a capacidade para fornecer mais doses de vacinas de IPV para os indivíduos em necessidade destes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Conseqüentemente, a presente invenção fornece várias vacinas de IPV de dose reduzida (que pode ter apenas componentes de IPV ou podem ter componentes de IPV combinados com outros antígenos).

Conseqüentemente, em um aspecto a presente invenção fornece uma vacina de IPV da invenção que compreende poliovírus inativados tipo 1 em uma dose maior do que 10 unidades de antígeno D e menos do que 20 unidades de antígeno D, por exemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19 unidades de antígeno D.

Em uma forma de realização, a presente invenção fornece uma vacina de IPV da invenção que compreende poliovírus inativados tipo 3 em uma dose de 8 a 20 unidades de antígeno D, por exemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 unidades de antígeno D.

Em uma outra forma de realização, a presente invenção fornece uma vacina de IPV da invenção que compreende poliovírus inativados tipo 2 em uma dose de 2 a 4 unidades de antígeno D, por exemplo, 2, 3 ou 4 unidades de antígeno D.

Em uma outra forma de realização, a presente invenção fornece uma vacina de IPV da invenção que compreende ainda toxóide da difteria e/ou toxóide do tétano e/ou uma vacina da coqueluche na forma de vacina Pw de célula inteira morta ou antígenos da coqueluche acelulares.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece uma vacina de IPV da invenção que é uma vacina de combinação de DTP-IPV isenta de tiomersal que compreende poliovírus inativados tipo 1 em uma dose entre 10

e 36 unidades de antígeno D.

Em uma outra forma de realização, a presente invenção fornece uma vacina de combinação de DTP-IPV isenta de tiomersal da invenção que compreende poliovírus inativados tipo 2 em uma dose de 2 a 7
5 unidades de antígeno D, por exemplo, 5, 6 ou 7 unidades de antígeno D.

Em uma outra forma de realização, a presente invenção fornece uma vacina de combinação de DTP-IPV isenta de tiomersal da invenção que compreende poliovírus inativados tipo 3 em uma dose de 8 a 29
10 unidades de antígeno D, por exemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ou 29 unidades de antígeno D.

Em uma outra forma de realização, as vacinas da presente invenção também pode compreender um ou mais antígenos selecionados do grupo que consiste de: antígeno de superfície da Hepatite B, antígeno(s) b de Haemophilus influenzae, antígeno(s) A de Neisseria meningitidis,
15 antígeno(s) C de Neisseria meningitidis, antígeno(s) W de Neisseria meningitidis, antígeno(s) Y de Neisseria meningitidis, vesícula ou antígeno(s) B de Neisseria meningitidis, antígeno(s) da Hepatite A e antígeno(s) Salmonella typhi, em particular antígenos de sacarídeo capsular das ditas bactérias.

20 Métodos de fabricar as vacinas da invenção também são fornecidos.

DEFINIÇÕES

O termo “vacina” é opcionalmente substituível com o termo “composição imunogênica” e vice e versa.

25 “unidades de antígeno D” (também aludido como “unidades internacionais” ou IU): A forma antigênica D do poliovírus induz anticorpos neutralizadores protetores. As unidades de antígeno D aqui aludidas (por exemplo nas vacinas da invenção) são as unidades de antígeno D totais medidas de cada tipo de antígeno de IPV volumoso não

absorvido antes da formulação da vacina final que são adicionadas em cada dose humana de vacina formulada (tipicamente 0,5 ml de volume final). Métodos confiáveis de medir unidades de antígeno D são bem conhecidos na técnica e são publicados, por exemplo, pela European Pharmacopoeia.

5 Por exemplo, unidades de antígeno D podem ser medidas usando o teste de ELISA como descrito no Exemplo 1 (“quantificação de antígeno D pelo ELISA”) abaixo. A European Pharmacopoeia fornece uma amostra de teste (European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation – disponível de Ph. Eur. Secretariat, por exemplo, Code P 216 0000) para padronização
10 de tais métodos entre os fabricantes (Pharmeuropa Special Issue, Bio 96-2). Assim o valor unitário do antígeno D é bem entendido na técnica.

O termo “dose” aqui é tipicamente uma administração da vacina da invenção, que é tipicamente uma injeção. Uma dose humana típica é de 0,5 ml. Naturalmente várias doses podem ser administradas em um
15 programa de administração de vacina.

O termo “IPV” ou uma vacina que compreenda estes componentes aqui é intencionado a significar vírus da pólio inativado tipo 1 (por exemplo, Mahoney, como preferivelmente usado, ou Brunhilde como vendido pela Statens Serum Institut sob o nome de DiTeKiPol), tipo 2 (por
20 exemplo, MEF-1), ou tipo 3 (por exemplo, Saukett), ou uma combinação de dois ou todos os três destes tipos. Um exemplo de uma vacina de IPV de dose completa (ou padrão) (40-8-32 unidades de antígeno D dos tipos 1, 2 e 3 do IPV respectivamente) para os propósitos desta invenção pode ser Poliorix® (GSK Biologicals S.A.). Assim, onde é aqui estabelecido que X % de uma
25 dose padrão de IPV está presente em uma vacina da invenção são intencionadas unidades de antígeno D que equivalem a X % de 40, 8 e/ou 32 unidades de antígeno D dos tipos 1, 2 e/ou 3 de IPV respectivamente (como medidas em cada tipo de antígeno do IPV volumosa) são formulados dentro de cada dose da dita vacina.

Os termos “lipopolissacarídeo” (LPS) e “lipooligossacarídeo” (LOS) são intercambiáveis.

O termo “sacarídeo” por todo este relatório descritivo pode indicar polissacarídeo ou oligossacarídeo e inclui ambos. O antígeno de
 5 sacarídeo capsular pode ser um polissacarídeo de tamanho natural ou pode ser estendido aos ‘sacarídeos de um determinado tamanho’ e ‘oligossacarídeos’ bacterianos (que naturalmente têm um número baixo de unidades de repetição, ou que são polissacarídeos reduzidos em tamanho para manuseabilidade, mas são ainda capazes de induzir uma resposta imune
 10 protetor em um hospedeiro) que são bem conhecidos na técnica da vacina (ver por exemplo a EP 497525).

O termo “ácido nucléico” aqui pode compreender ácido desoxirribonucléico (DNA) de filamento único ou duplo ou ácido ribonucléico (RNA) de filamento único ou duplo ou uma mistura destes.

15 Os termos “componente(s)” de um patógeno ou “componente(s) que proporcionam proteção para um tal patógeno” dentro das vacinas da invenção aqui são intencionados a significar um ou mais antígeno(s) deste patógeno.

O termos “em torno” ou “aproximadamente” aqui são
 20 intencionados a significar $\pm 10 \%$ do valor estabelecido, mas devem estar de acordo com o contexto de uso.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Evolução da Potência Relativa (RP) de DTPwSF-HB-IPV “Método de produção 3” com a dose de IPV.

25 A potência da dose reduzida de IPV das formulações “Método de produção 3” foi examinada in vivo em comparação com a formulação de referência (formulação Poliorix e DTPaIPVHB). A RP de IPV foi medida em doses a 100 %, 50 %, 25 % e 12,5 % da dose de IPV padrão (40/8/32 unidades de antígeno D para os tipos 1/2/3).

Figura 2. Evolução da Potência Relativa (RP) do fluxograma da formulação DTPwSF-HB-IPV.

A potência da dose reduzida de IPV tanto para a formulação do “Método de produção 3” quanto do “Método de produção 4” foi examinada in vivo em comparação com formulações de referência (formulação Poliorix e DTPaIPVHB). A RP foi medida tanto para o “Método de produção 3” quanto para o “Método de produção 4” a 25 % da dose de IPV padrão (40/8/32 unidades de antígeno D para os tipos 1/2/3) em comparação com um placebo com apenas 25 % de IPV.

Figura 3. Potência Relativa dos tipos 1, 2 e 3 de IPV nos tempos de 0 e 8 meses.

A Potência Relativa de IPV foi medida [em relação à DTPaHBIPV (Pediarix) (Figura 3a) ou Poliorix (Figura 3b)] para determinar se o componente Hib tem um efeito sobre a potência do IPV e para avaliar a estabilidade de IPV com o tempo em doses diferentes de IPV.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção fornece uma vacina (por exemplo, uma vacina de combinação) que compreende antígenos de poliovírus (IPV) e opcionalmente *Corynebacterium diphtheriae* (D), *Clostridium tetani* (T), *Bordetella pertussis* (P) ou Hepatite B.

Os antígenos da invenção

Componentes da vacina de IPV

As vacinas da invenção podem ser compreendidas 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 preparar poliovírus inativados (IPV) são bem conhecidos na técnica. Em uma forma de realização, o IPV deve compreender tipos 1, 2 e 3 como é comum na técnica da vacina e pode ser a vacina Salk da pólio que é inativada com formaldeído (ver por exemplo, Sutter et al., 2000,

Pediatr. Clin. North Am. 47: 287; Zimmerman & Spann 1999, Am Fam Physician 59: 113; Salk et al., 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).

5 Em uma forma de realização o IPV não é absorvida (por exemplo, antes de misturar com outros componentes se presentes). Em uma outra forma de realização, o(s) componente(s) do IPV da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio (por exemplo, antes ou depois de misturar com outros componentes se presentes).

10 Em uma outra forma de realização, o(s) componente(s) do IPV da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o(s) componente(s) do IPV pode(m) ser absorvido(s) em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Se absorvido, um ou mais componentes de IPV podem ser

15 absorvidos separadamente ou juntos como uma mistura. O IPV pode ser estabilizada por um processo de secagem particular como descrito na WO2004/039417.

 O poliovírus pode ser cultivado em cultura de célula. A cultura de célula pode ser uma linhagem de célula VERO ou PMKC, que é uma

20 linhagem de célula contínua derivada de rim de macaco. As células VERO podem ser convenientemente cultivadas em microcarregadores. A cultura das células VERO antes e durante a infecção viral pode envolver o uso de material derivado de bovino, tal como soro de bezerro e este material deve ser obtido de fontes que são isentas da encefalite espongiforme bovina (BSE). A

25 cultura também pode envolver materiais tais como hidrolisado de lactalbumina. Depois do cultivo, virions podem ser purificados usando técnicas tais como ultrafiltração, diafiltração e cromatografia. Antes da administração ao pacientes, os vírus devem ser inativados e isto pode ser obtido pelo tratamento com formaldeído.

Os vírus podem ser cultivados, purificados e inativados individualmente e depois combinados para dar uma mistura volumosa concentrada para o uso como vacina de IPV ou para adição ao antígeno da difteria e tétano absorvido e componentes da coqueluche para as vacinas que

5 compreendem DTPw-IPV ou DTPa-IPV.

Os antígenos nas vacinas da invenção estarão presentes em “quantidades imunologicamente eficazes” isto é a administração desta quantidade a um indivíduo, em uma dose única ou como parte de uma série, é eficaz para o tratamento ou prevenção de doença. O tratamento de dosagem

10 podem ser um programa de dose única ou um programa de dose múltipla (por exemplo, incluindo doses reforçadoras).

As doses padrão de vacinas da pólio no momento atual tendem a conter 40 unidades de antígeno D de poliovírus inativados tipo 1, 8 unidades de antígeno D de poliovírus inativados tipo 2 e 32 unidades de antígeno D de poliovírus inativados tipo 3 (por exemplo, Infanrix-IPV®).

15

Entretanto, os presentes inventores surpreendentemente descobriram que doses reduzidas de IPV podem ser usadas para se obter uma boa resposta imune. Em uma forma de realização, uma vacina de dose de IPV da presente invenção pode compreender entre 10 e 36 unidades de antígeno D do IPV tipo 1 (por exemplo, 11 a 32, 12 a 28, 13 a 24, 14 a 20 ou 15 a 19 unidades de antígeno D). Em uma outra forma de realização, uma vacina de dose de IPV da presente invenção pode compreender IPV tipo 1 em uma dose de 10 a 20 unidades de antígeno D ou uma dose maior do que 10 unidades de antígeno D e menor do que 20 unidades de antígeno D. Em uma outra forma

20 de realização, uma dose de vacina da presente invenção pode compreender 26 a 49 %, 30 a 45 %, 33 a 40 %, 35 a 37 %, ou aproximada ou exatamente um terço de dose unitária de antígeno D 40 padrão de IPV tipo 1 (equivalente a aproximadamente 10,4 a 19,6, 12 a 18, 13,2 a 16, 14 a 14,8 ou 13,3 unidades de antígeno D). Em uma outra forma de realização, uma vacina de dose de

25

IPV da presente invenção pode compreender 11 a 32 unidades de antígeno D, 12 a 28 unidades de antígeno D, 13 a 24 unidades de antígeno D ou 14 a 20 unidades de antígeno D de IPV tipo 1.

Alternativamente, uma vacina de dose de IPV da presente
5 invenção pode compreender 10 a 19,5 unidades de antígeno D, 12 a 19 unidades de antígeno D, 14 a 18,5 unidades de antígeno D, ou 15 a 17 unidades de antígeno D; por exemplo em torno de ou exatamente 16 unidades de antígeno D de IPV tipo 1.

Em uma outra forma de realização, as vacinas da presente
10 invenção podem compreender menos do que 4 unidades de antígeno D, 2 a 4 unidades de antígeno D (equivalente a 25 a 50 % de dose unitária de antígeno D 8 padrão) ou em torno de ou exatamente 3 unidades de antígeno D de IPV tipo 2 (equivalente a 37,5 % de dose unitária de antígeno D 8 padrão).

Em uma outra forma de realização, a vacina da presente
15 invenção pode compreender aproximada ou exatamente um terço de dose unitária de antígeno D 8 padrão de IPV tipo 2 (equivalente a aproximadamente 2,7 unidades de antígeno D).

Em uma outra forma de realização, as vacinas da presente
invenção pode compreender 2 a 7 unidades de antígeno D de IPV tipo 2. Em
20 uma outra forma de realização, uma vacina de dose de IPV da presente invenção pode compreender 3 a 6 unidades de antígeno D, ou 4 a 5 unidades de antígeno D de IPV tipo 2.

Alternativamente, uma vacina de dose de IPV da presente
invenção pode compreender 24,5 unidades de antígeno D, 2,5 a 4 unidades de
25 antígeno D ou 3 a 3,5 unidades de antígeno D de IPV tipo 2.

Em uma outra forma de realização as vacinas da presente
invenção podem compreender 8 a 20 unidades de antígeno D, mais do que 8 e
menos do que 20 unidades de antígeno D, 9 a 19 unidades de antígeno D, 10 a
18 unidades de antígeno D, 11 a 17 unidades de antígeno D, 12 a 16 unidades

de antígeno D, ou 13 a 15 unidades de antígeno D; por exemplo em torno de ou exatamente 14 unidades de antígeno D de IPV tipo 3 (equivalente a 25 a 62,5 %, 28,125 a 59,375 %, 31,25 a 46,875 % ou 43,75 % de dose unitária de antígeno D 32 padrão).

5 Em uma outra forma de realização, a vacina da presente invenção pode compreender aproximada ou exatamente um terço de dose unitária de antígeno D 32 padrão de IPV tipo 3 (equivalente a aproximadamente 10,7 unidades de antígeno D).

10 Em uma outra forma de realização, uma vacina de dose de IPV da presente invenção pode compreender 8 a 29 unidades de antígeno D, 9 a 26 unidades de antígeno D, 10 a 23 unidades de antígeno D, 11 a 20 unidades de antígeno D, 12 a 17 unidades de antígeno D, ou 13 a 14 unidades de antígeno D de IPV tipo 3.

15 Alternativamente, uma vacina de dose de IPV da presente invenção pode compreender 8 a 19,5 unidades de antígeno D, 9 a 19 unidades de antígeno D, 10 a 18,5 unidades de antígeno D, 11 a 18 unidades de antígeno D, 12 a 17,5 unidades de antígeno D, 13 a 17 unidades de antígeno D, ou 14 a 16 unidades de antígeno D; por exemplo em torno de ou exatamente 15 unidades de antígeno D.

20 Componentes de vacina DTP

As vacinas DTP são vacinas bem conhecidas para prevenir ou tratar as doenças de difteria, tétano e B. pertussis. As vacinas da invenção podem compreender componente(s) da difteria, tétano e/ou coqueluche.

25 O antígeno da difteria é tipicamente um toxóide da difteria. A preparação de toxóides da difteria (DT) é bem documentada. Qualquer toxóide da difteria adequado pode ser usado. Por exemplo, DT pode ser produzido pela purificação da toxina a partir de uma cultura de *Corynebacterium diphtheriae* seguida pela destoxificação química, mas é alternativamente fabricada pela purificação de um recombinante ou análogo

geneticamente destoxificado da toxina (por exemplo, CRM197 ou outros mutantes como descrito nas US 4.709.017, US 5.843.711, US 5.601.827 e US 5.917.017). Em uma forma de realização DT está presente em uma quantidade de 5 a 50, 7 a 30 Lf ou aproximada ou exatamente 7,5 Lf ou 25 Lf por dose de 0,5 ml. Em uma outra forma de realização DT está presente em uma dose baixa de menos do que 5 Lf ou 1 a 4 Lf ou aproximada ou exatamente 2 Lf por dose de 0,5 ml. Em uma forma de realização, o toxóide da difteria da invenção pode ser absorvido em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, o toxóide da difteria da invenção pode ser absorvido em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o toxóide da difteria pode ser absorvido em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio.

O antígeno do tétano da invenção é tipicamente um toxóide do tétano. Os métodos de preparar toxóides do tétano (TT) são bem conhecidos na técnica. Em uma forma de realização TT é produzido pela purificação da toxina a partir de uma cultura de *Clostridium tetani* seguida pela destoxificação química, mas é alternativamente fabricada pela purificação de um recombinante ou análogo geneticamente destoxificado da toxina (por exemplo, como descrito na EP 209281). Qualquer toxóide do tétano adequado pode ser usado. ‘Toxóide do tétano’ pode abranger fragmentos imunogênicos da proteína de tamanho natural (por exemplo Fragmento C – ver a EP 478602). Em uma forma de realização TT está presente em uma quantidade de 2,5 a 30 Lf, 3 a 20 Lf, 5 a 15 Lf ou exata ou aproximadamente 10 Lf por dose de 0,5 ml. Em uma forma de realização, o toxóide do tétano da invenção pode ser absorvido em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, o toxóide do tétano da invenção pode ser absorvido em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o toxóide do tétano podem ser absorvido em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio.

O componente da coqueluche da invenção pode ser acelular (Pa) onde antígenos da coqueluche purificados são usados ou célula integral (Pw) onde coqueluche de célula inteira morta é usada como o componente da coqueluche. Pw pode ser inativado por vários métodos conhecidos, incluindo métodos isentos de mercúrio. Tais métodos podem incluir a inativação por calor (por exemplo, 55 a 65° C ou 56 a 60° C, por 5 a 60 minutos ou por 10 a 30 minutos, por exemplo, 60° C por 30 minutos), formaldeído (por exemplo, 0,1 % a 37°, 24 horas), glutaraldeído (por exemplo, 0,05 % na temperatura ambiente, 10 minutos), acetona-I (por exemplo, três tratamentos na temperatura ambiente) ou acetona-II (por exemplo, três tratamentos na temperatura ambiente e quatro tratamentos a 37° C) (ver por exemplo Gupta et al., 1987, J. Biol. Stand. 15: 87; Gupta et al., 1986, Vaccine, 4: 185). Métodos de preparar célula integral morta de Bordetella pertussis (Pw) adequada para esta invenção são divulgados na WO 93/24148, como o são métodos de formulação adequados para produzir vacinas de DT-TT-Pw-HepB. Tiomersal foi usado no passado na preparação de célula integral morta de Bordetella pertussis (ver abaixo). Entretanto, em uma forma de realização o mesmo não é usado no processo de formulação das vacinas da presente invenção.

Uma dose Pw de 5 a 50 IOU, 7 a 40 IOU, 9 a 35 IOU, 11 a 30 IOU, 13 a 25 IOU, 15 a 21 IOU ou em torno de ou exatamente 20 IOU é tipicamente usada.

As vacinas de Pa acelulares também são bem conhecidas e podem compreender 2 ou mais antígenos de: toxóide da coqueluche (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactinaa (PRN), aglutinógenos 2 & 3. Em uma forma de realização, a vacina Pa compreende PT, FHA e PRN. Kits ou vacinas da invenção podem compreender PT destoxificado por um método bem conhecido de tratamento com formaldeído ou por meio de mutações (derivado de PT). As substituições de resíduos dentro da subunidade 51 da

proteína foram descobertas resultar em uma proteína que retém as suas propriedades imunológicas e protetores do PT, mas com toxicidade reduzida ou nenhuma (EP 322533). As mutações de destoxificação debatidas nas reivindicações da EP322533 são exemplos dos mutantes de DT destoxificados da presente invenção. Tais mutantes podem ser usados em doses mais baixas do que 20 a 25 µg.

Em uma forma de realização PT é usado em uma quantidade de 2 a 50 µg, 5 a 40 µg, 10 a 30 µg ou exata ou aproximadamente 25 µg por dose de 0,5 ml. Em uma outra forma de realização PT é usado em uma quantidade exata ou aproximadamente de 2,5 ou 8 µg por dose de 0,5 ml.

Em uma forma de realização FHA é usado em uma quantidade de 2 a 50 µg, 5 a 40 µg, 10 a 30 µg ou exata ou aproximadamente 25 µg por dose de 0,5 ml. Em uma outra forma de realização FHA é usado em uma quantidade exata ou aproximadamente de 2,5 ou 8 µg por dose de 0,5 ml.

Em uma forma de realização PRN é usado em uma quantidade de 0,5 a 20 µg, 0,8 a 15 µg, 2 a 10 µg ou exata ou aproximadamente 8 µg por dose de 0,5 ml. Em uma outra forma de realização PRN é usado em uma quantidade de exatamente ou em torno 0,8 ou 2,5 µg por 0,5 ml.

Em uma forma de realização, o componente da coqueluche da invenção pode ser absorvido em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, o componente da coqueluche da invenção pode ser absorvido em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o componente da coqueluche pode ser absorvido em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Por exemplo em uma forma de realização pelo menos PRN é absorvido em hidróxido de alumínio com PT/FHA absorvido em hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio ou uma mistura de ambos.

Outros antígenos

As formulações de vacina da invenção, opcionalmente também

compreendendo DTP (DTPw ou DTPa), podem compreender adicionalmente um ou mais antígenos selecionados do grupo que consiste de: antígeno de superfície da Hepatite B, antígeno(s) b de *Haemophilus influenzae*, antígeno(s) A de *Neisseria meningitidis*, antígeno(s) C de *Neisseria meningitidis*, antígeno(s) W-135 de *Neisseria meningitidis*, antígeno(s) Y de *Neisseria meningitidis*, vesícula B de *Neisseria meningitidis* ou antígeno(s) purificados, antígeno(s) da Hepatite A, antígeno(s) da *Salmonella typhi* e RTS.S. Tipicamente o sacarídeo capsular ou antígenos de LOS destes patógenos podem ser usados. Os antígenos tipicamente estarão presentes em uma concentração de pelo menos 1 µg/ml cada um, por exemplo 1 a 20 µg/ml, 2 a 15 µg/ml, 2,5 a 10 µg/ml, 3 a 8 µg/ml ou 4 a 6 µg/ml. No geral, a concentração de qualquer antígeno será suficiente para evocar uma resposta imune contra este antígeno. É preferido que a eficácia protetor de antígenos individuais não seja removida pela combinação dos mesmos, embora a imunogenicidade real (por exemplo, títulos de ELISA) possa ser reduzida.

O(s) antígeno(s) adicional(is) em uma forma de realização da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, os antígenos adicionais da invenção podem ser absorvidos em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização os antígenos adicionais podem ser absorvidos em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio ou podem ser não absorvidos.

Onde um sacarídeo capsular ou antígeno LOS são usados estes podem ser conjugados a uma proteína carregadora que compreenda epítomos auxiliares T de modo a realçar a imunogenicidade. A invenção também pode compreender “proteínas carregadoras” livres.

Como uma alternativa ao uso de antígenos de proteína nas composições da invenção, o ácido nucléico que codifica o antígeno pode ser usado. Os componentes de proteína das composições da invenção podem ser

assim substituídos pelo ácido nucléico (por exemplo DNA, que pode estar na forma de um plasmídeo) que codifica a proteína. Similarmente, as composições da invenção podem compreender proteínas que imitam antígenos de sacarídeo por exemplo, mimótopos ou anticorpos anti-idiotípicos. Estes podem substituir componentes sacarídicos individuais ou podem suplementá-los.

Antígeno da Hepatite B

A preparação de antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg) é bem documentada. Ver por exemplo, Hartford et al., 1983, Develop. Biol. Standard 54: 125, Gregg et al., 1987, Biotechnology 5: 479, EP0226846, EP0299108. Este pode ser preparado como segue. Um método envolve purificar o antígeno na forma particulada a partir do plasma de portadores da hepatite B crônica, visto que quantidades grandes de HBsAg são sintetizadas no fígado e liberados na corrente sanguínea durante uma infecção pelo HBV. Um outro método envolve expressar a proteína pelos métodos de DNA recombinante. O HBsAg pode ser preparado pela expressão na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pichia, células de inseto (por exemplo, Hi5) ou células de mamífero. O HBsAg pode ser inserido em um plasmídeo e a sua expressão a partir do plasmídeo pode ser controlada por um promotor tal como o promotor “GAPDH” (a partir do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). A levedura pode ser cultivada em um meio sintético. O HBsAg pode ser depois purificado por um processo que envolve as etapas tais como precipitação, cromatografia de troca iônica e ultrafiltração. Depois da purificação, HBsAg pode ser submetido à diálise (por exemplo, com cisteína). O HBsAg pode ser usado em uma forma particulada.

Como aqui usada a expressão “antígeno de superfície da Hepatite B” ou “HBsAg” inclui qualquer antígeno de HBsAg ou fragmento deste que demonstra a antigenicidade de antígeno de superfície de HBV. Será

entendido que além da sequência de 226 aminoácidos do antígeno HBsAg S (ver Tiollais et al., 1985, Nature 317: 489 e referências nesta) o HBsAg como aqui descrito pode, se desejado, contém toda ou parte de uma sequência pré-S como descrito nas referências acima e na EP0278940. Em particular, o

5 HBsAg pode compreender um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que compreende os resíduos de 133 a 145 seguidos pelos resíduos de 175 a 400 da proteína L de HBsAg em relação à matriz de leitura aberta em um vírus da Hepatite B do sorotipo ad (este polipeptídeo é aludido como L*; ver a EP0414374). HBsAg dentro do escopo da invenção também

10 pode incluir o polipeptídeo preS1-preS2 -S descrito na EP0198474 (Endotronics) ou análogos deste tais como aqueles descritos na EP0304578 (McCormick e Jones). HBsAg como aqui descrito pode também referir-se aos mutantes, por exemplo o “mutante de escape” descrito na WO 91/14703 ou EP0511855A1, especialmente HBsAg em que a substituição de aminoácido

15 na posição 145 é para arginina de glicina.

O HBsAg pode estar na forma de partícula. As partículas podem compreender por exemplo a proteína S sozinha ou podem ser partículas compósitas, por exemplo L*, S) onde L* é como definido acima e S denota a proteína S de HBsAg. A dita partícula está vantajosamente na forma

20 em que a mesma é expressada na levedura.

Em uma forma de realização, HBsAg é o antígeno usado na EngerixBTM (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), que é ainda descrito na WO93/24148.

Em uma forma de realização, HBsAg está presente em uma

25 quantidade de 5 a 20 µg, 8 a 15 µg ou aproximada ou exatamente 10 µg por dose de 0,5 ml.

O antígeno de superfície da Hepatite B pode ser absorvido em fosfato de alumínio, o que podem ser feito antes de misturar com os outros componentes (descritos na WO93/24148). O componente da Hepatite B deve

ser substancialmente isento de tiomersal (o método de preparação de HBsAg sem tiomersal foi anteriormente publicado na EP1307473).

Antígeno(s) b de Haemophilus influenzae

As vacinas que compreendem antígenos de Haemophilus influenzae tipo B foram descritas na WO97/00697. As vacinas da invenção podem usar qualquer antígeno de Haemophilus influenzae tipo B adequado. O antígeno pode ser sacarídeo capsular (PRP) de Haemophilus influenzae tipo B conjugado a uma proteína carregadora (Hib). O sacarídeo é um polímero de ribose, ribitol e fosfato. O antígeno Hib pode ser opcionalmente absorvido em fosfato de alumínio como descrito na WO97/00697 ou pode ser não absorvido como descrito na WO02/00249 ou pode não ter passado por um processo específico de absorção.

Por um antígeno que é 'não absorvido em um sal adjuvante de alumínio' aqui é intencionado por exemplo que uma etapa de expressão ou absorção dedicada para o antígeno em sal adjuvante de alumínio fresco não está envolvido no processo de formular a composição.

Hib pode ser conjugada a qualquer carregador que possa fornecer pelo menos um epítipo auxiliar T (exemplos dos quais são descritos abaixo) e podem ser toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM-197 (mutante da toxina da difteria) ou Proteína D.

Hib pode ser liofilizada e pode ser reconstituída extemporaneamente (por exemplo, com diluente, que opcionalmente compreende outros componentes antigênicos das vacinas da invenção).

Em uma forma de realização, Hib está presente em uma quantidade de 5 a 20 µg, 8 a 15 µg ou aproximada ou exatamente 10 µg de sacarídeo por dose de 0,5 ml.

Em uma outra forma de realização, Hib está presente em uma dose baixa (por exemplo, 1 a 6 µg, 2 a 4 µg ou em torno de ou exatamente 2,5 µg de sacarídeo) como descrito na WO 02/00249.

Antígenos tipos A, C, W ou Y de Neisseria meningitidis

As vacinas da invenção podem compreender ainda um sacarídeo capsular de uma bactéria selecionada do grupo que consiste de N. meningitidis tipo A (MenA, opcionalmente conjugado a uma proteína carregadora), N. meningitidis tipo C (MenC, opcionalmente conjugado a uma
5 proteína carregadora), N. meningitidis tipo W-135 (MenW, opcionalmente conjugado a uma proteína carregadora) e N. meningitidis tipo Y (MenY, opcionalmente conjugado a uma proteína carregadora).

As vacinas da invenção podem compreender um ou mais
10 antígenos das diferentes cepas de N. meningitidis, que podem ser usadas sozinhas ou em qualquer combinação de dois, três ou quatro componentes como detalhado abaixo:

MenA, MenC, MenW, MenY ou MenA + MenC, MenA + MenW, MenA + MenY, MenC + MenW, MenC + MenY, MenW + MenY ou
15 MenA + MenC + MenW, MenA + MenC + MenY, MenA + MenW + MenY, MenC + MenW + MenY ou MenA + MenC + MenW + MenY.

Em uma forma de realização, o(s) componente(s) de Neisseria meningitidis da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, o(s)
20 componente(s) de Neisseria meningitidis da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o(s) componente(s) de Neisseria meningitidis da invenção pode(m) ser absorvido(s) em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Em uma forma de realização o(s) componente(s) de
25 Neisseria meningitidis da invenção pode(m) ser não absorvido(s) em um adjuvante, por exemplo, um sal adjuvante de alumínio.

Vesícula tipo B ou antígeno(s) de Neisseria meningitidis

As vacinas da invenção também podem compreender um componente de MenB tal como uma vesícula ou bolha de membrana externa

como descrito na WO01/09350, WO03/105890, WO04/014417 ou WO04/014418 ou um conjugado de antígeno de sacarídeo capsular de MenB (ou derivado deste) (por exemplo, ver a WO 96/40239) ou um LOS meningocócico livre ou conjugado LOS meningocócico L2 ou L3 ou L2 e L3 (como para a WO 2004/014417). Em uma forma de realização, o(s) componente(s) de MenB da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, o(s) componente(s) MenB da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o(s) componente(s) de MenB pode(m) ser absorvido(s) em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Em uma forma de realização o(s) componente(s) de MenB pode(m) ser não absorvido em um adjuvante, por exemplo, um sal adjuvante de alumínio.

Antígeno(s) de Salmonella typhi

As vacinas da invenção podem compreender ainda o sacarídeo Vi de Salmonella typhi, que podem ser o produto registrado Typherix®, descrito na EP1107787 ou um conjugado deste (por exemplo, com uma proteína carregadora como descrito aqui). O processo de conjugação pode ser realizado como descrito na WO 2007/000343. Em uma forma de realização, o(s) sacarídeo(s) Vi da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, o(s) sacarídeo(s) Vi da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o(s) sacarídeo(s) Vi pode(m) ser absorvido(s) em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Em uma forma de realização o(s) sacarídeo(s) Vi pode(m) ser não absorvido(s) em um adjuvante, por exemplo, um sal adjuvante de alumínio.

Antígeno(s) da Hepatite A

O componente que proporciona proteção contra a Hepatite A

pode ser uma vacina da Hepatite A atenuada morta, por exemplo o produto conhecido como Havrix® (Marca Registrada da GlaxoSmithKline Biologicals S.A.) que é uma vacina atenuada morta derivada da cepa HM-175 do vírus da Hepatite A (HAV) (ver a “Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A” por F. E. Andre et al., 1980, Prog. Med. Virol. 37: 72 e a monografia do produto “Havrix” publicada pela SmithKline Beecham Biologicals 1991). Flehmig et al. (1990, Prog. Med Virol. 37: 56) revisaram os aspectos clínicos, virologia, imunologia e epidemiologia da Hepatite A e debateram métodos para o desenvolvimento de vacinas contra esta infecção viral comum. Como aqui usado a expressão “antígeno de HAV” refere-se a qualquer antígeno capaz de estimular o anticorpo neutralizador para o HAV em seres humanos. Em uma forma de realização o antígeno de HAV compreende partículas virais atenuadas inativadas ou em uma outra forma de realização o mesmo pode ser um capsídeo de HAV ou proteína viral de HAV, que podem ser convenientemente obtidos pela tecnologia de DNA recombinante. Em uma forma de realização, o componente da Hepatite A da invenção pode ser absorvido em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, o componente da Hepatite A da invenção pode ser absorvido em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o componente da Hepatite A pode ser absorvido em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio.

Antígeno(s) da Malária

As vacinas da invenção podem compreender ainda antígeno(s) da malária. O antígeno da malária pode ser RTS.S (proteína híbrida entre CS e HBsAg – descrito na US 6.306.625 e EP 0614465). Em uma forma de realização, RTS.S pode ser usado nas vacinas da invenção no lugar de HBsAg. Outros antígenos da malária também podem ser usados nas vacinas da invenção, incluindo a proteína CS, RTS, TRAP, proteína de 16 kD de B 2992, AMA-1, MSP1, opcionalmente incluindo CpG (WO2006/029887,

WO98/05355, WO01/00231).

Em uma forma de realização, o(s) antígeno(s) da malária da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como hidróxido de alumínio. Em uma outra forma de realização, o(s) antígeno(s) da malária da invenção pode(m) ser absorvido(s) em um sal de alumínio tal como fosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização o(s) antígeno(s) da malária pode(m) ser absorvido(s) em uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Em uma forma de realização o antígeno da malária é adjuvantado com uma emulsão de óleo em água e/ou derivado de lipídeo A (tal como MPL) e ou esterol (tal como colesterol) e/ou tocol (tal como α -tocoferol). Em uma outra forma de realização o antígeno(s) da malária pode(m) ser não absorvido(s) em um adjuvante, por exemplo, um sal adjuvante de alumínio.

Conjugados

Os sacarídeos capsulares bacterianos conjugados da invenção podem compreender qualquer polipeptídeo, polipeptídeo ou proteína carregadores que compreendem pelo menos um epítipo auxiliar T. A(s) proteína(s) carregadora(s) usada(s) pode(m) ser selecionada(s) do grupo que consiste de: toxóide do tétano, toxóide da difteria, CRM197, toxina da difteria recombinante (como descrito em qualquer uma das US 4.709.017, WO 93/25210, WO 95/33481 ou WO 00/48638), pneumolisina (de modo opcional quimicamente destoxificado ou um mutante destoxificado) de *S. pneumoniae* (ver por exemplo, a WO 2004/081515 e referências nesta aludidas), OMPC de *N. meningitidis* (EP 0372501) e proteína D (PD) de *H. influenzae* (EP 594610). Outros carregadores podem incluir polipeptídeos sintéticos (EP 0378881; EP 0427347), proteínas de choque térmico (WO 93/17712; WO 94/03208), proteínas da coqueluche (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 que

compreendem epítomos de célula T CD4⁺ humanos múltiplos de vários antígenos derivados de patógeno (Falugi et al., 2001, Eur. J. Immunol. 31: 3816), proteína de superfície pneumocócica PspA (WO 02/091998), proteínas de captação de ferro (WO 01/72337), toxina A ou B de *C. difficile* (WO 00/61761), PhtD pneumocócico (WO 00/37105), PhtDE pneumocócico (por exemplo, WO 01/98334 & WO 03/054007), PhtX, etc.

Os sacarídeos podem estar todos no mesmo carregador, particularmente todos os sacarídeos de um organismo particular, por exemplo sacarídeos de MenA, MenC, MenW e MenY podem estar todos conjugados a TT, DT ou CRM-197. Entretanto, devido ao efeito conhecido da supressão de carregador, pode ser vantajoso se em cada uma das composições da invenção os antígenos de sacarídeo neste contidos (antígenos 'n') são conjugados a mais do que um carregador. Assim (n-1) dos sacarídeos seriam carregados (separadamente) em um tipo de carregador e 1 em um carregador diferente ou (n-2) em um e 2 em dois carregadores diferentes, etc. Por exemplo, em uma vacina contendo 4 sacarídeos bacterianos conjugados, 1, 2 ou todos os quatro seriam conjugados em carregadores diferentes). A proteína D, entretanto, pode ser usada para vários (2, 3, 4 ou mais) sacarídeos em uma composição sem um efeito de supressão de carregador acentuado. Hib pode estar presente como um conjugado de TT, DT ou CRM197 e MenA, MenC, MenY e MenW podem ser conjugados a TT, DT, CRM197 ou PD. Vi pode estar presente como um conjugado de TT, DT ou CRM197. A Proteína D é um carregador útil visto que ela fornece um antígeno adicional que pode fornecer proteção contra *H. influenzae*. Em uma forma de realização, todos os sacarídeos são conjugados à mesma proteína carregadora.

Vi pode ser conjugada a uma proteína carregadora por exemplo por um método usando a química da condensação de carbodiimida (por exemplo, EDAC) (dado que a subunidade de repetição de Vi compreende grupos do ácido carboxílico). Isto pode ser obtido (i) por uma única reação da

carbodiimida entre COOH de Vi e NH₂ da proteína ou (ii) por uma reação dupla da carbodiimida que pode ocorrer entre COOH de Vi e NH₂ de uma molécula ligadora homobifuncional e COOH da proteína e NH₂ da molécula ligadora homobifuncional ou entre COOH de Vi e NH₂ da molécula ligadora heterobifuncional e NH₂ da proteína e COOH da molécula ligadora heterobifuncional.

A conjugação pode ser usada em conjugação com proteína(s) carregadora(s) livre(s). Em uma forma de realização, quando uma dada proteína carregadora está presente tanto na forma livre quanto na conjugada em uma composição da invenção, a forma não conjugada não é maior do que 5 % da quantidade total da proteína carregadora na composição como um todo ou em uma outra forma de realização está presente em menos do que 2 % em peso.

O sacarídeo pode ser ligado à proteína carregadora por qualquer método conhecido (por exemplo, por Likhite, Patente U.S. 4.372.945 e por Armor et al., Patente U.S. 4.474.757), com qualquer ligador adequado onde necessário.

O sacarídeo tipicamente será ativado ou funcionalizado antes da conjugação. A ativação pode envolver, por exemplo, agentes de cianilação tais como CDAP (tetrafluoroborato de 1-cian-dimetilamino-piridínio) (WO 95/08348 & WO 96/29094). A reação de cianilação pode ser realizada sob condições relativamente branda, que evita a hidrólise dos sacarídeos sensíveis ao meio alcalino. Esta síntese permite a ligação direta a uma proteína carregadora. Outras técnicas adequadas usam carbodiimidas, hidrazidas, ésteres ativos, norbornano, ácido p-nitrobenzóico, N-hidroxissuccinimida, S-NHS, EDC ou TSTU.

As ligações por intermédio de um grupo ligador 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 a aminação redutiva do sacarídeo, que liga o grupo amino resultante com uma extremidade de um grupo ligador de ácido adípico (EP 0477508, Porro et al., 1985, Mol. Immunol. 22: 907, EP 0208375) e depois ligando uma proteína à outra extremidade do grupo ligador de ácido adípico. Outros

5 ligadores incluem B-propionamido (WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Geyer et al., 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

10 ligador, a ligação direta pode ser usada. As ligações diretas à proteína podem compreender a oxidação do sacarídeo seguida pela aminação redutiva com a proteína, como descrito, por exemplo na US 4.761.283 e US 4.356.170 ou uma reação de CDAP direta.

Depois da conjugação, os sacarídeos livres e conjugados

15 podem ser separados. Existem muitos métodos adequados para esta separação, incluindo a cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração, etc (ver também Lei et al., 2000, Dev Biol. (Basel), 103: 259; WO 00/38711; US 6.146.902). Em uma forma de realização, se uma vacina compreende um dado sacarídeo tanto na forma livre quanto na conjugada, a

20 forma não conjugada não é maior do que 20 % em peso da quantidade total deste sacarídeo na composição como um todo (por exemplo, 15 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 %).

Uma quantidade de sacarídeo que é capaz de conferir proteção a um hospedeiro (uma quantidade eficaz) pode ser determinada pela pessoa

25 habilitada. Em uma forma de realização, cada dose compreenderá de 0,1 a 100 µg de sacarídeo, em uma outra forma de realização cada dose compreenderá de 0,1 a 50 µg, em uma outra forma de realização cada dose compreenderá de 0,1 a 10 µg, já em uma outra forma de realização cada dose compreenderá de 1 a 5 µg.

Adjuvantes

As vacinas da invenção podem incluir um excipiente farmacologicamente aceitável tal como um adjuvante adequado. Os 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 lipídeo A (MPL), derivados de lipídeo A (por exemplo, de toxicidade reduzida), MPL 3-O-desacilado, quil A, Saponina, QS21, tocol (EP 0382271), Adjuvante Incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), Adjuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), AS-2 (Smith-Kline Beecham, Filadélfia, PA), oligonucleotídeos de CpG, bioadesivos e mucoadesivos, micropartículas, lipossomas, formulações de éter de polioxietileno, formulações de éster de polioxietileno, polipeptídeos de muramila ou compostos de imidazoquinolona (por exemplo, imiquamod e seus homólogos). Imunomoduladores humanos adequados para o 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 estimulador de colônia de macrófago (M-CSF), fator de necrose de tumor (TNF), fator estimulador de colônia de granulócito macrófago (GM-CSF) também podem ser usados como adjuvantes.

Em uma forma de realização da invenção, a composição de adjuvante das formulações induz uma resposta imune predominantemente do tipo TH1. Os níveis altos de citocinas tipo TH1 (por exemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tendem a favorecer a indução de resposta imunes mediadas por célula para um antígeno administrado. Dentro de uma forma de realização, em que uma resposta é predominantemente tipo TH1, o nível de citocinas tipo TH1 aumentará a um grau maior do que o nível de citocinas tipo TH2. Os

níveis destas citocinas podem ser facilmente avaliados usando ensaios padrão. Para uma revisão das famílias de citocinas, ver a Mosmann e Coffman, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7: 145.

Consequentemente, os sistemas de adjuvante adequados que
5 promovem uma resposta predominantemente TH1 incluem, derivados de
lipídeo A (por exemplo, de toxicidade reduzida), Monofosforil lipídeo A
(MPL) ou um derivado deste, particularmente monofosforil lipídeo A 3-des-
O-acilado (3D-MPL) e uma combinação de monofosforil lipídeo A, de modo
opcional monofosforil lipídeo A 3-des-O-acilado junto com um sal de
10 alumínio. Um sistema realçado envolve a combinação de um monofosforil
lipídeo A e um derivado de saponina, particularmente a combinação de QS21
e 3D-MPL como divulgado na WO 94/00153 ou uma composição menos
reatogênica onde o QS21 é extinto com colesterol como divulgado na WO
96/33739. Uma formulação de adjuvante particularmente potente envolvendo
15 QS21, 3D-MPL e tocoferol em uma emulsão de óleo em água é descrita na
WO 95/17210. A vacina pode adicionalmente compreender uma saponina,
que pode ser QS21. A formulação também pode compreender uma emulsão
de óleo em água e tocoferol (WO 95/17210). CpG não metilado contendo
oligonucleotídeos (WO 96/02555) também são indutores preferenciais de uma
20 resposta TH1 e são adequados para o uso na presente invenção.

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

Qualquer adjuvante da invenção pode ser absorvido por ou
25 combinados com os componentes de IPV da invenção.

Quando da alusão ao hidróxido de alumínio ou fosfato de
alumínio, referência é feita a todos os adjuvantes de hidróxido de alumínio e
ou fosfato de alumínio como descritos por Hem e White (Pharm Biotechnol.
1995; 6: 249-276).

Em uma forma de realização, fosfato de alumínio também pode ser aludido como hidroxifosfato de alumínio. Em uma outra forma de realização, o fosfato de alumínio tem uma carga negativa em um pH de 7,4. Tipicamente, o ponto isoelétrico (pI) do fosfato de alumínio é de 5 a 7 ou de 6 a 7 ou em torno de ou exatamente 5. Em uma outra forma de realização, fosfato de alumínio tem uma razão molar de fosfato:alumínio de 0,3 a 0,9 ou de 0,3 a 0,6 ou de 0,8 a 0,9.

Em uma forma de realização, hidróxido de alumínio tem uma carga positiva em um pH de 7,4. Tipicamente, o pI do hidróxido de alumínio é de 8 a 11, de 9 a 11, de 10 a 11 ou em torno de ou exatamente 11.

Tipicamente, o teor de alumínio total é de 200 a 1000 μg , 300 a 900 μg , 400 a 800 μg , 500 a 700 μg ou em torno de ou exatamente 630 μg de Al^{3+} por dose de 0,5 ml. Este pode ser tudo hidróxido de alumínio ou tudo fosfato de alumínio. Alternativamente o teor de Al^{3+} pode ser de uma mistura de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio na seguinte proporção: 1:8 a 8:, 1:4 a 4:1, 3:8 a 8:3, 1:2 a 2:1 ou 1:1 de fosfato de alumínio:hidróxido de alumínio. Em uma forma de realização uma razão de 12:1 a 4:1, 11:1 a 5:1, 10:1 a 6:1, 9:1 a 7:1 ou 8:1 de fosfato de alumínio:hidróxido de alumínio é usada.

Embora a maior parte do alumínio seja fornecida pelos antígenos pré-absorvidos antes da mistura para formar uma vacina de combinação, algum alumínio pode ser adicionada na forma livre durante a formulação da vacina de combinação da invenção, por exemplo, antes da etapa de ajuste do pH aqui descrita. Tipicamente, o teor de alumínio livre por dose de 0,5 ml pode ser de 0 a 300 μg , 50 a 250 μg , 75 a 200 μg , 100 a 150 μg ou em torno de ou exatamente 115 μg de Al^{3+} . O Al^{3+} livre pode ser todo $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou todo AlPO_4 ou uma mistura de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e AlPO_4 na seguinte proporção (w:w $\text{Al}^{3+}:\text{Al}^{3-}$): 1:1 a 1:6, 1:1,1 a 1:5, 1:1,2 a 1:4, 1:1,3 a 1:3, 1:1,4 a 1:2, por exemplo, 23/92 ou 69/46 ou 6:1 a 1:1, 5:1 a 1,1:1, 4:1 a 1,2:1,

3:1 a 1,3:1, 2:1 a 1,4:1, por exemplo, 46/69 ou 92/23.

Alternativamente certos componentes das vacinas da invenção podem não ser expressamente absorvidos em adjuvante, em particular os sais de alumínio.

5 IPV pode ser não absorvido ou absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou uma mistura de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e AlPO_4 . DT pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 , TT pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 , Pw pode ser absorvido em ou misturado com AlPO_4 , PRN pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$, FHA pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$, PT pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$, HB pode ser absorvido em AlPO_4 , Hib pode ser absorvido em AlPO_4 ou não absorvido, Men ACWY pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 ou não absorvido, o componente MenB pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 ou não absorvido, Vi pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 ou não absorvido, HepA pode ser absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 .

15 Os antígenos que são pré-absorvidos em um sal de alumínio podem ser pré-absorvidos individualmente antes de misturar. Em uma outra forma de realização, uma mistura de antígenos pode ser pré-absorvida antes da mistura com outros adjuvantes. Em uma forma de realização, IPV pode ser absorvido separadamente ou como uma mistura de IPV tipos 1, 2 e 3 ou quando misturado com componentes D e T absorvidos.

20 O significado de “antígeno absorvido” é por exemplo intencionado a significar mais do que 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % ou 90 % absorvido.

25 O significado dos termos “fosfato de alumínio” e “hidróxido de alumínio” como aqui usados inclui todas as formas de hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio que são adequadas para adjuvantar vacinas. Por exemplo, fosfato de alumínio pode ser um precipitado de fosfato de alumínio insolúvel (amorfo, semi-cristalino ou cristalino), que pode ser de modo opcional mas não exclusivamente preparado misturando-se sais de

alumínio e sais do ácido fosfórico solúveis. “Hidróxido de alumínio” pode ser um precipitado de hidróxido de alumínio insolúvel (amorfo, semi-cristalino ou cristalino), que pode ser de modo opcional mas não exclusivamente preparado pela neutralização de uma solução de sais de alumínio.

- 5 Particularmente adequados 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 Adjuphos (fosfato de alumínio, suspensão a 2 % em solução salina) fornecido pela Brenntag Biosector (Dinamarca).

10 Componentes não imunológicos de vacinas da invenção

- As vacinas da invenção tipicamente, além dos componentes antigênicos e adjuvantes mencionados acima, compreenderá um ou mais “carregadores ou excipientes farmacologicamente aceitáveis”, que incluem qualquer excipiente que por si só não induz a produção de anticorpos nocivos
- 15 para o indivíduo que recebe a composição. Os excipientes adequados são tipicamente macromoléculas grandes, lentamente metabolizados tais como proteínas, sacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, sacarose (Paoletti et al., 2001, Vaccine, 19: 2118), trealose (WO 00/56365), lactose e agregados lipídicos
- 20 (tais como gotículas oleosas ou lipossomas). Tais carregadores são bem conhecidos por aqueles de habilidade comum na técnica. As vacinas também podem conter diluentes, tais como água, solução salina, glicerol, etc. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes de umectação ou emulsificação, substâncias tamponizadoras de pH e outras, podem estar
- 25 presentes. A solução salina fisiológica isenta de pirogênio estéril, tamponada com fosfato é um carregador típico. Um debate completo de excipientes farmacologicamente aceitáveis está disponível na referência Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edição, ISBN: 0683306472.

As composições da invenção podem ser liofilizadas ou na forma aquosa, isto é soluções ou suspensões. As formulações líquidas deste tipo permitem que as composições sejam administradas diretamente da sua forma embalada, sem a necessidade para reconstituição em um meio aquoso e são assim ideais para a injeção. As composições podem ser apresentadas em frascos ou elas podem ser apresentadas em seringas já enchidas. As seringas podem ser fornecidas com ou sem agulhas. Uma seringa incluirá uma dose única da composição, ao passo que um frasco pode incluir uma dose única ou doses múltiplas (por exemplo, 2 doses). Em uma forma de realização a dose é para o ser humano. Em uma outra forma de realização a dose é para um ser humano adulto, adolescente, criança entre um e três anos, bebê ou menor do que um ano de idade e pode ser administrada pela injeção.

As vacinas líquidas da invenção também são adequadas para reconstituir outras vacinas a partir de uma forma liofilizada. Onde uma vacina deva ser usada para tal reconstituição extemporânea, a invenção fornece um kit, que pode compreender dois frascos ou pode compreender uma seringa já enchida e um frasco, com os conteúdos da seringa sendo usados para reconstituir os conteúdos do frasco antes da injeção.

As vacinas da invenção podem ser embaladas na forma de dose unitária ou na forma de dose múltipla (por exemplo, 2 doses). Para as formas de dose múltipla, os frascos são preferidos às seringas pré-enchidas. Os volumes de dosagem eficazes podem ser rotineiramente estabelecidos, mas uma dose humana típica da composição para injeção tem um volume de 0,5 ml.

Em uma forma de realização, as vacinas da invenção têm um pH dentre 6,0 e 8,0, em uma outra forma de realização as vacinas da invenção têm um pH dentre 6,3 e 6,9, por exemplo, $6,6 \pm 0,2$. As vacinas podem ser tamponadas neste pH. O pH estável pode ser mantido pelo uso de um tampão. Se uma composição compreende um sal de hidróxido de alumínio, um tampão

de histidina pode ser usado (WO03/009869). A composição deve ser estéril e/ou isenta de pirogênio.

As composições da invenção podem ser isotônicas com respeito aos seres humanos.

5 As vacinas da invenção podem incluir um antimicrobiano, particularmente quando embaladas em um formato de dose múltipla. Tiomersal deve ser evitado visto que este leva à perda de potência do componente de IPV. Outros antimicrobianos podem ser usados, tais como 2-fenoxietanol ou parabenos (metil, etil, propil parabenos). Qualquer
10 conservante está preferivelmente presente em níveis de dose baixos. O conservante pode ser adicionado exogenamente e/ou pode ser um componente dos antígenos de volume que são misturados para formar a composição (por exemplo, presente como um conservante em antígenos da coqueluche).

 Em uma forma de realização, as vacinas da invenção são
15 isentas de tiomersal ou substancialmente isentas de tiomersal. Por “isento de tiomersal” ou “substancialmente isento de tiomersal” é intencionado que não haja tiomersal suficiente presente na formulação final para impactar negativamente a potência do componente de IPV. Por exemplo, se tiomersal é usado durante o processo de purificação de Pw ou antígeno de superfície da
20 Hepatite B o mesmo deve ser substancialmente removido antes da mistura com IPV. O teor de tiomersal na vacina final deve ser menor do que 0,025 µg/µg de proteína, 0,02 µg/µg de proteína, 0,01 µg/µg de proteína ou 0,001 µg/µg de proteína, por exemplo 0 µg/µg de proteína. Em uma forma de realização, tiomersal não é adicionado nem usado na purificação de qualquer
25 componente. Ver por exemplo a EP1307473 para a Hepatite B e ver o acima para processos de Pw onde a morte é obtida não na presença de tiomersal.

 As vacinas da invenção podem compreender detergente por exemplo, um Tween (polissorbato), tal como Tween 80. Os detergentes estão no geral presentes em níveis baixos por exemplo, < 0,01 %.

As vacinas da invenção podem incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio) para dar tonicidade. A composição pode compreender cloreto de sódio. Em uma forma de realização, a concentração de cloreto de sódio na composição da invenção está na faixa de 0,1 a 100 mg/ml (por exemplo, 1 a 50 mg/ml, 2 a 20 mg/ml, 5 a 15 mg/ml) e em uma outra forma de realização a concentração de cloreto de sódio é de 10 ± 2 mg/ml de NaCl por exemplo, cerca de 9 mg/ml.

As vacinas da invenção no geral incluirão um tampão. Um tampão de fosfato ou histidina é típico.

As vacinas da invenção podem incluir íons fosfato livres em solução (por exemplo, pelo uso de um tampão de fosfato) de modo a favorecer a não absorção de antígenos. A concentração de íons fosfato livres na composição da invenção está em uma forma de realização entre 0,1 e 10,0 mM ou em uma outra forma de realização entre 1 e 5 mM ou em uma outra forma de realização de cerca de 2,5 mM.

Propriedades das vacinas da invenção

Em uma forma de realização as vacinas da invenção são formuladas como uma vacina para a administração in vivo ao hospedeiro em um tal modo que os componentes individuais da composição sejam formulados tal que a imunogenicidade de componentes individuais não seja substancialmente prejudicada por outros componentes individuais da composição. Por não substancialmente prejudicada, é intencionado que na imunização, um título de anticorpo contra cada componente seja obtido que é maior do que 60 %, 70 %, 80 % ou 90 % ou 95 a 100 % do título obtido quando o antígeno é administrado em isolamento. Assim, em formas de realização preferidas, nenhum efeito (significamente) nocivo ocorre aos componentes adicionais (em termos de eficácia protetor) na combinação quando comparado com a sua administração em isolamento.

Formulações de Vacina

Em uma forma de realização, as vacinas da invenção são formuladas como uma vacina para a administração in vivo ao hospedeiro, tal que confirmam um título de anticorpo superior ao critério para a soroproteção para cada componente antigênico para uma porcentagem aceitável de pacientes humanos. Isto é um teste importante na avaliação de uma eficácia da vacina por toda a população. Antígenos com um título de anticorpo associado acima do qual um hospedeiro é considerado ser soroconvertido contra o antígeno são bem conhecidos e tais títulos são publicados pelas organizações tais como WHO. Em uma forma de realização, mais do que 80 % de uma amostra estatisticamente significativa de pacientes são soroconvertido, em uma outra forma de realização mais do que 90 % de uma amostra estatisticamente significativa de pacientes são soroconvertidos, em uma outra forma de realização mais do que 93 % de uma amostra estatisticamente significativa de pacientes é soroconvertida e já em uma outra forma de realização 96 a 100 % de uma amostra estatisticamente significativa de pacientes são soroconvertido.

A quantidade de antígeno em cada dose de vacina é selecionada como uma quantidade que induz uma resposta imunoprotetor sem efeitos colaterais adversos, significantes nas vacinas típicas. Tal quantidade variará dependendo de quais imunógenos específicos são utilizados. No geral é esperado que cada dose compreenderá de 1 a 1000 µg de imunógeno total ou de 1 a 100 µg ou 1 a 40 µg ou 1 a 5 µg. Uma quantidade ótima para uma vacina particular pode ser averiguada pelos estudos envolvendo a observação de títulos de anticorpo e outras respostas em pacientes. Um curso de vacinação primária pode incluir 2 a 3 doses de vacina, dadas de um a dois meses separadamente, por exemplo, seguindo as recomendações da WHO para a imunização de DTP (isto é no primeiro ano de vida). As doses reforçadoras podem seguir no segundo e/ou em ano(s) subsequente(s) de vida.

Potência da pólio como medida pelo teste de soroneutralização em ratos

Para o propósito da invenção, o ensaio para a avaliação quantitativa de IPV da potência da vacina das vacinas contendo IPV da invenção deve ser realizado usando uma dose única de vacina e deve ser feito pela determinação da razão do título médio geométrico da vacina de teste (GMT) para o GMT da vacina de referência e é relatado como a resposta relativa (RR) ou potência relativa (RP). O GMT de referência pode ser o GMT obtido com qualquer vacina de IPV que compreenda 40-8-32 unidades de antígeno D de IPV tipos 1-2-3 respectivamente e pode ser o GMT obtido com a vacina Poliorix® conhecida. Tipicamente, o teste de RP é realizado como segue:

A potência de poliovírus Tipos 1, 2 e 3 é determinada em ratos pela soroneutralização:

Grupos de 10 ratos saudáveis (Sprague-Dawley (OFA) ou qualquer cepa validada de antemão) são inoculados intramuscularmente com as diluições (1/1,25; 1/3,125; 1/7,81) das amostras de teste ou material de referência em solução salina tamponada com fosfato. Se necessário, a faixa de diluição pode ser estendida a 4 diluições pela inoculação de vacina não diluída e as três diluições anteriormente mencionadas. Dez ratos inoculados com o diluente são usados como controles negativos. Os ratos são observados uma vez por semana para detectar qualquer reação anormal. 20 a 22 dias depois da inoculação, cada animal é profundamente anestesiado e sangrado e o soro é coletado para ser analisado pelo teste de soroneutralização.

Para o teste de soroneutralização, os soros são inativados pela incubação a 56° C por 30 minutos em um banho de água. Três séries de diluição dos soros, uma para cada tipo de pólio, são preparadas em microplacas usando o meio de diluição apropriado. As placas são armazenadas a + 4° C.

Para os três tipos de vírus da pólio, uma quantidade pré

determinada de vírus (30 a 300 CCID₅₀) é adicionada às diluições de soro. As três suspensões de vírus são diluídas levando-se em conta os seus respectivos títulos. A diluição final é chamada de ‘diluição de trabalho’. Cada diluição de trabalho é adicionada às microplacas correspondentes. As placas são depois seladas e incubadas a 37° C ± 1° C por 16 horas. As células Hep-2 são depois adicionadas e as microplacas são incubadas a 37° C ± 1° C por 7 dias. O efeito citopatogênico (CPE) do vírus é lido usando um microscópio invertido depois da coloração com azul de Coomassie. A presença de anticorpos anti-poliomielite inibe o crescimento dos vírus e o aparecimento do CPE correspondente. Os títulos de vírus anti-pólio (tipo 1, 2 e 3) correspondem à recíproca da última diluição sem qualquer CPE. Em cada grupo, animais com anticorpos neutralizadores são registrados e o título de anticorpo de cada amostra de soro é determinado para os diferentes tipos de poliovírus. O título do anticorpo neutralizador é expressado como o log₂ da inversa da diluição mais alta da amostra sérica que inibe totalmente o efeito citopático de poliovírus em células Hep-2.

O título médio geométrico por diluição (GMT) e por tipo de vírus também é determinado para cada grupo de ratos.

Empacotamento de vacinas da invenção

Vacinas da invenção podem ser empacotadas em vários tipos de recipiente por exemplo, em frascos, em seringas, etc. Um frasco de dose múltipla tipicamente compreenderá um orifício plástico re-selável através do qual uma agulha estéril pode ser inserida para remover uma dose de vacina, que re-sela uma vez que a agulha tenha 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 administrar a um hospedeiro em uma única injeção ou podem ser administrados concomitantemente em sítios diferentes. A dose da vacina ou cada vacina se um kit é administrado concomitantemente

(em dois ou mais recipientes) tipicamente será de 0,5 ml.

Em uma forma de realização deste aspecto da invenção é fornecido um kit que compreende duas vacinas multi-valentes para conferir proteção em um hospedeiro contra doença causada pelo poliovírus, Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae e de modo opcional um ou mais de Hepatite B, Haemophilus influenza tipo B, Neisseria meningitidis tipo A, Neisseria meningitidis tipo C, Neisseria meningitidis tipo W, Neisseria meningitidis tipo Y, Neisseria meningitidis tipo B, Salmonella typhi, Hepatite A ou Malária.

- 10 O kit compreende um primeiro recipiente que compreende:
- (1) (a) vírus da pólio inativado (IPV) da invenção,
 - (b) toxóide da difteria (DT ou D) (ver a acima),
 - (c) toxóide do tétano (TT ou T) (ver a acima),
 - (d) célula integral morta de Bordetella pertussis (Pw) ou 2 ou
 - 15 mais componentes da coqueluche acelulares (Pa) (ver acima),
 - (e) de modo opcional antígeno de superfície da Hepatite B (HepB ou HB) (ver acima),
 - (f) de modo opcional um conjugado de uma proteína carregadora e o sacarídeo capsular de H. influenzae tipo B (Hib) (ver acima),
 - 20 (g) de modo opcional cada um ou ambos dos conjugados de uma proteína carregadora e um sacarídeo capsular de um N. meningitidis tipo A (MenA) ou N. meningitidis tipo C (MenC) (ver a acima), e
- um segundo recipiente que compreende:
- (2A)(a) conjugados de uma proteína carregadora e um
 - 25 sacarídeo capsular de N. meningitidis tipo A (MenA), N. meningitidis tipo C (MenC), N. meningitidis tipo W (MenW) e/ou N. meningitidis tipo Y (MenY) (ver acima para as várias combinações de sacarídeo Men da invenção), e
 - (b) de modo opcional um conjugado de uma proteína carregadora e o sacarídeo capsular de H. influenzae tipo B (Hib); ou

(2B) (a) um conjugado de uma proteína carregadora e o sacarídeo capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib), e

(b) de modo opcional um conjugado de uma proteína carregadora e sacarídeo Vi de *Salmonella typhi*

5 O kit pode de modo opcional compreender um terceiro recipiente que compreende:

(3) (a) de modo opcional antígeno de superfície da Hepatite B

(b) de modo opcional um conjugado de uma proteína carregadora e sacarídeo Vi de *Salmonella typhi*

10 Os recipientes podem em cada caso adicionalmente compreender antígeno(s) HepA e/ou antígeno(s) MenB e/ou RTS.S e/ou antígeno(s) de *Streptococcus pneumoniae*.

Em cada caso, o mesmo antígeno não deve estar presente em ambos os recipientes.

15 Em uma forma de realização o primeiro recipiente tem além dos componentes a), b), c), d) também e), f), g), e) + f), e) + g), f) + g) ou e) + f) + g).

Em uma forma de realização a vacina do primeiro recipiente pode ser líquida e a vacina do segundo recipiente pode ser líquida ou liofilizada (por exemplo, na presença de um excipiente de estabilização conhecido tal como sacarose ou trealose).

20

Os recipientes do kit podem ser empacotados separadamente ou, de modo opcional, empacotados juntos. Em uma forma de realização, o kit é fornecido com um lista de instruções para a administração das vacinas nos dois ou mais recipientes.

25

Em uma forma de realização, onde um recipiente em um kit contém um certo conjugado de sacarídeo, o mesmo conjugado não está presente nos outros recipientes do kit.

Os inventores acreditam que um kit fornecido no modo acima

pode vantajosamente apresentar os vários antígenos a um sistema imune hospedeiro em uma maneira ótima. O kit pode munir um médico com um método ideal de imunizar um hospedeiro com uma ou mais das seguintes vantagens: eficácia protetor para todos os antígenos, reatogenicidade mínima, interferência de supressão de carregador mínima, interferência de adjuvante/antígeno mínima ou interferência antígeno/antígeno mínima. Em um tal modo, estas metas podem ser obtidas com o número mínimo de (duas) administrações, de modo a ocorrer opcionalmente na mesma visita ao médico.

Em uma forma de realização as vacinas dos primeiro e segundo recipientes são administradas concomitantemente em sítios diferentes (como descrito abaixo sob “administração de vacinas da invenção”) e em uma forma de realização alternativa os inventores pressentem que os conteúdos do primeiro e segundo recipientes podem ser misturados (de modo extemporaneamente opcional) antes da administração como uma vacina única.

Preparar vacinas da invenção

A presente invenção também fornece um método para produzir uma formulação de vacina que compreende a etapa de misturar os componentes da vacina juntos com um excipiente farmacologicamente aceitável.

Em uma forma de realização da presente invenção é fornecida uma vacina como aqui descrita para o uso em um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças causadas pela infecção pelo poliovírus e de modo opcional Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, vírus da Hepatite B, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis tipo A, Neisseria meningitidis tipo C, Neisseria meningitidis tipo W, Neisseria meningitidis tipo Y, Salmonella typhi ou Hepatite A.

Em uma outra forma de realização da invenção é fornecido um uso das vacinas da invenção na fabricação de um medicamento para o

tratamento ou prevenção de doenças causadas pela infecção pelo poliovírus e de modo opcional *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium difteriae*, vírus da Hepatite B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Salmonella typhi* ou Hepatite A.

Adicionalmente, um método de imunizar um ser humano hospedeiro contra doença causada pelo poliovírus e de modo opcional *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium difteriae*, vírus da Hepatite B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Salmonella typhi* ou Hepatite A, método este que compreende administrar ao hospedeiro uma dose imunoprotetor da vacina da invenção também é fornecido.

A quantidade de antígeno em cada dose de vacina é selecionada como uma quantidade que induz uma resposta imunoprotetor sem efeitos colaterais adversos, significantes em vacinas típicas. Tal quantidade variará dependendo de qual imunógeno específico é utilizado e como o mesmo será apresentado. Em uma forma de realização cada dose compreenderá de 0,1 a 100 µg de sacarídeo, em uma outra forma de realização cada dose compreenderá de 0,1 a 50 µg, em uma outra forma de realização cada dose compreenderá de 0,1 a 10 µg, já em uma outra forma de realização cada dose compreenderá de 1 a 5 µg de sacarídeo.

Em uma forma de realização, o conteúdo de antígenos de proteína na vacina estará na faixa de 1 a 100 µg, em uma outra forma de realização o conteúdo de antígenos de proteína nas vacinas estará na faixa de 5 a 50 µg, em uma outra forma de realização o conteúdo de antígenos de proteína nas vacinas estará na faixa de 5 a 25 µg.

A preparação de vacina é no geral descrita em Vaccine Design [“The subunit and adjuvant approach” (eds Powell M. F. & Newman M. J.)

(1995) Plenum Press Nova Iorque]. A encapsulação dentro de lipossomas é descrita por Fullerton, Patente US 4.235.877. Conjugação de proteínas às macromoléculas é divulgada, por exemplo por Likhite, Patente US 4.372.945 e por Armor et al., Patente US 4.474.757. O uso de Quil A é divulgado por
5 Dalsgaard et al., 1977, Acta Vet Scand. 18: 349. 3D-MPL está disponível da Ribi Immunochem, USA 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 outra forma de realização da invenção é fornecida uma vacina multi-valente que compreende poliovírus inativados (IPV) da
10 invenção e de modo opcional célula integral morta de Bordetella pertussis (Pw), toxóide do tétano (TT), toxóide da difteria (DT), um conjugado de uma proteína carregadora e o sacarídeo capsular de H. influenzae tipo B (Hib – de modo opcional conjugado a TT, DT ou CRM197), em que a quantidade de conjugado por dose de 0,5 ml de vacina volumosa é de 1 a 8 µg e a
15 imunogenicidade do conjugado é equivalente ou melhorado em relação a tais composições que compreendem quantidades maiores de conjugado. Opcionalmente, antígeno de superfície da Hepatite B também pode ser incluído.

Em uma forma de realização a quantidade de conjugado por
20 dose de 0,5 ml de vacina volumosa é menor do que 10 µg (de sacarídeo no conjugado), em uma outra forma de realização a quantidade de conjugado é de 1 a 7, em uma outra forma de realização a quantidade de conjugado é de 2 a 6 µg ou em uma outra forma de realização de cerca de 2,5, 3, 4 ou 5 µg.

Será avaliado que certos componentes, por exemplo
25 componentes DTPw, podem ser combinados separadamente antes de adicionar o HBsAg absorvido ou outros componentes.

Um método para fabricar vacinas da invenção também é fornecido que compreende a etapa de misturar IPV tipo 1, IPV tipo 2 e/ou IPV tipo 3 com um excipiente farmacêuticamente aceitável. Um processo

típico para preparar vacina volumosa da invenção com outros antígenos adicionarão os componentes de IPV a uma mistura dos componentes D e T, isto é os componentes DT são misturados com os componentes de IPV. Esta ordem de misturar possibilita que a concentração iônica e/ou o pH da
5 composição sejam ajustados (por exemplo, $\text{pH} < 7$) antes da adição dos componentes de Pa ou Pw. Tipicamente, HB pré-absorvido em AlPO_4 é adicionado primeiro se incluído na composição, seguido pela adição de DT pré-absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 , seguido pela adição de TT pré-absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou AlPO_4 , seguido pela adição de IPV de modo
10 opcional pré-absorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$, antes do ajuste do pH para por exemplo, $\text{pH } 5,9$ a $7,2$ ou $\text{pH } 6$ a 7 ou $\text{pH } 6,2$ a $6,8$ ou $\text{pH } 6,4$ a $6,6$ e depois a adição de Pw pré-absorvido em AlPO_4 . Opcionalmente, os antígenos Hib, Vi, MenA, MenC, MenW, Men Y, MenB e/ou HepA podem ser adicionados em qualquer ponto neste processo. Em uma forma de realização, os antígenos Hib, Vi,
15 MenA, MenC, MenW, Men Y, MenB e/ou HepA são adicionados antes do ajuste do pH. Em uma forma de realização um ou mais antígenos da invenção são absorvidos em fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio ou uma mistura de ambos. Em uma outra forma de realização os antígenos da invenção são misturados com um excipiente farmacêuticamente aceitável e/ou
20 adjuvante(s).

Em uma forma de realização, a composição de vacina da invenção pode ser preparada na seguinte ordem: HBsAg pré-absorvido é adicionado, seguido pelo toxóide da difteria pré-absorvido, seguido pelo toxóide do tétano pré-absorvido e IPV, o pH é depois ajustado para
25 aproximadamente $6,5$ antes da adição de Pw pré-absorvido.

Em uma outra forma de realização, a composição de vacina da invenção pode ser preparada na seguinte ordem: toxóide do tétano pré-absorvido é adicionado, seguido por IPV, seguido por HBsAg pré-absorvido, seguido por toxóide da difteria pré-absorvido, o pH é depois ajustado a

aproximadamente 6,5 antes de adicionar Pw pré-absorvido.

No geral, as composições de vacina combinadas de acordo com qualquer aspecto da invenção podem ser preparadas como segue: O IPV, DTPw, HepB, MenA, MenC, MenW, MenY, MenB, Vi, Hepatite A ou outros
5 componentes são pré-absorvidos em um adjuvante adequado, especialmente hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio ou uma mistura de ambos. Depois deixando tempo para a absorção completa e estável dos respectivos componentes, os componentes diferentes são combinados sob condições apropriadas. O(s) conjugado(s) Hib, Vi, MenA, MenC, MenW e/ou MenY
10 pode(m) ser ou absorvidos ou não em sal adjuvante de alumínio antes de serem misturados com a vacina de DTPw.

Em uma forma de realização, as vacinas da invenção são preparadas entre 15° C e 30° C (por exemplo, entre 19° C e 27° C ou a $23 \pm 4^\circ \text{C}$).

Administração de vacinas da invenção

15 A invenção fornece um método para incitar uma resposta imune em um mamífero, que compreende a etapa de administrar uma quantidade eficaz de uma vacina da invenção. As vacinas podem ser administradas profilaticamente (isto é para prevenir a infecção). A resposta imune é preferivelmente protetor e preferivelmente envolve anticorpos. O
20 método pode incitar uma resposta reforçadora.

A seguir de uma vacinação inicial, os pacientes podem receber uma ou diversas imunizações de reforço (subsequentes) adequadamente espaçadas. O tratamento de dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de dose múltipla. As doses múltiplas podem ser usadas em um
25 programa de imunização primária e/ou em um programa de imunização de reforço. Um programa de dose primária, que pode ser no primeiro ano de vida, pode ser seguido por um programa de dose de reforço. O controle de tempo adequado entre as doses de imprimação (por exemplo, entre 4 a 16 semanas) e entre imprimação e reforço pode ser rotineiramente determinada.

Em uma forma de realização, o mamífero é um ser humano. Onde a vacina é para o uso profilático, o ser humano é preferivelmente uma criança (por exemplo, uma criança entre um e três anos ou bebê) ou um adolescente; onde a vacina é para o uso terapêutico, o ser humano é preferivelmente um adulto. Uma vacina pretendida para criança também pode ser administrada aos adultos por exemplo, para avaliar a segurança, dosagem, imunogenicidade, etc.

As preparações de vacina da presente invenção podem ser usadas para proteger ou tratar um mamífero suscetível à infecção, por meio de administração da dita vacina diretamente a um paciente. a liberação direta pode ser realizada pela administração parenteral (intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea, intravenosamente ou ao espaço intersticial de um tecido); ou pela administração retal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar ou outra administração mucósica. Em uma forma de realização, a administração é pela injeção intramuscular na coxa ou no ante braço. A injeção pode ser por intermédio de uma agulha (por exemplo, uma agulha hipodérmica), mas a injeção sem agulha pode alternativamente ser usada. Uma dose intramuscular típica é de 0,5 ml.

As infecções bacterianas afetam várias áreas do corpo e assim as composições da invenção podem ser preparadas em várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injetáveis, como soluções ou suspensões líquidas. A composição pode ser preparada para a administração pulmonar por exemplo, como um inalador, usando um pó fino ou pulverização. A composição pode ser preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para a administração nasal, aural ou ocular por exemplo, como pulverização, gotas, gel ou pó (ver por exemplo, Almeida & Alpar, 1996, J Drug Targeting, 3: 455; Bergquist et al., 1998, APMIS, 106: 800). A administração intranasal bem sucedida de vacinas de

DTP foi relatada (Ryan et al., 1999, Infect. Immun., 67: 6270; Nagai et al., 2001, Vaccine, 19: 4824).

Em uma forma de realização as vacinas do primeiro e segundo (e terceiro onde aplicável) recipientes são administradas concomitantemente em locais diferentes e em uma forma de realização alternativa os inventores preveem que os conteúdos do primeiro e segundo recipientes podem ser misturados (de modo opcional extemporaneamente) antes da administração como uma vacina única.

A invenção pode ser usada para evocar imunidade sistêmica e/ou mucósica.

Um modo de checar a eficácia do tratamento terapêutico envolve monitorar a infecção bacteriana depois da administração da composição da invenção. Um modo de checar a eficácia do tratamento profilático envolve monitorar as respostas imunes contra os antígenos depois da administração da composição. A imunogenicidade das composições da invenção podem ser determinadas pela administração das mesmas aos pacientes de teste (por exemplo, crianças de 12 a 16 meses de idade ou modelos de animal – WO 01/30390) e depois determinar os parâmetros imunológicos padrão. Estas respostas imunes no geral serão determinadas em torno de 4 semanas depois da administração da composição e comparadas aos valores determinados antes da administração da composição. Ao invés de avaliar a eficácia protetor real em pacientes, o animal padrão e modelos in vitro e correlatos de proteção para avaliar a eficácia das vacinas de DTP são bem conhecidos.

Os termos “compreendendo”, “compreender” e “compreende” aqui são intencionados pelos inventores a serem de modo opcional substituíveis com os termos “que consiste de”, “consistir de” e “consiste de”, respectivamente, em todos os casos. Isto não muda o significado normal destes termos e é apenas intencionado a fornecer base para a substituição, não

para torná-los equivalentes no significado.

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

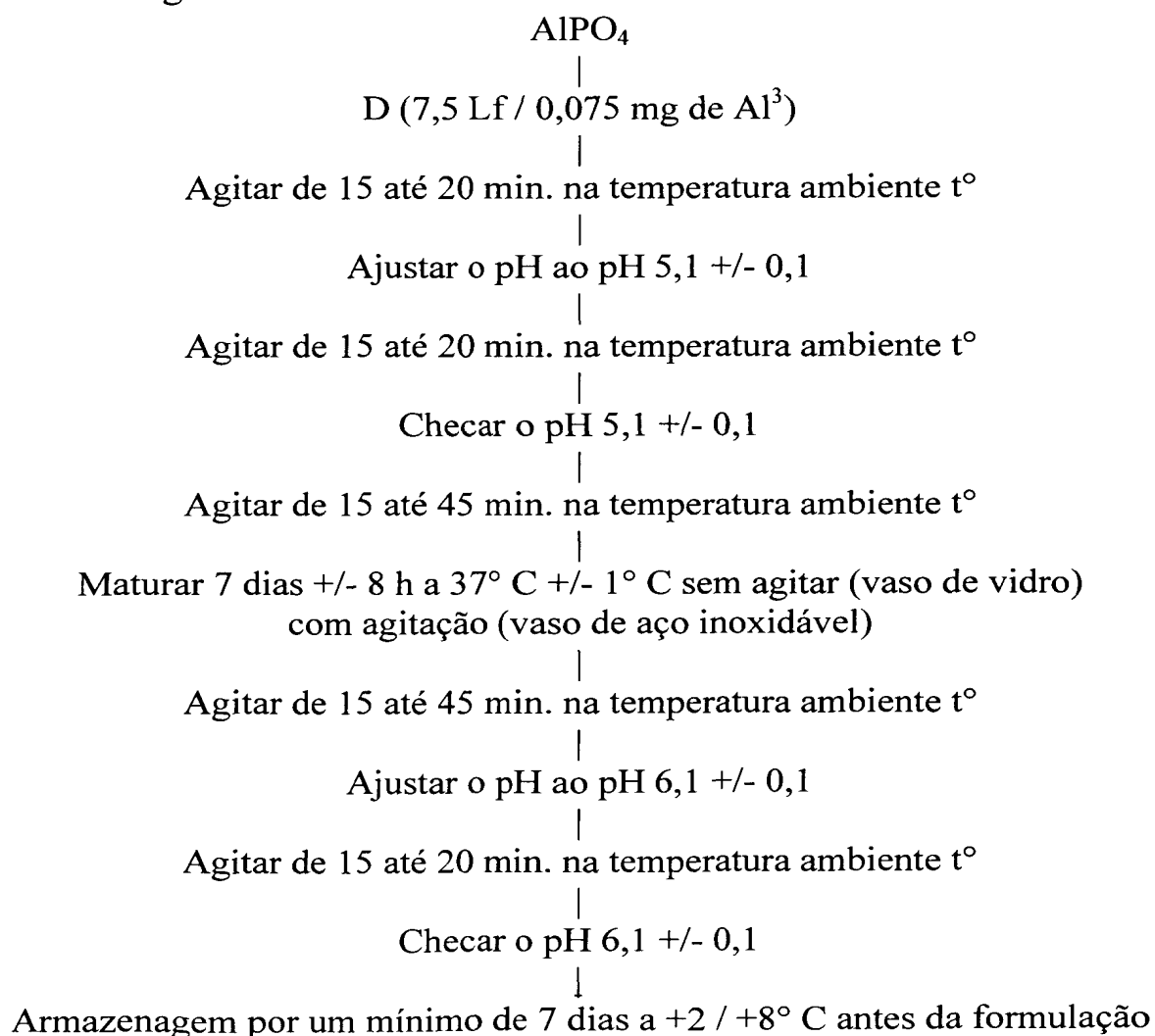
EXEMPLOS

- 5 Os exemplos são fornecidos unicamente para os propósitos de ilustração e não são intencionados a limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1: Testes em formulações de IPV de dose baixa

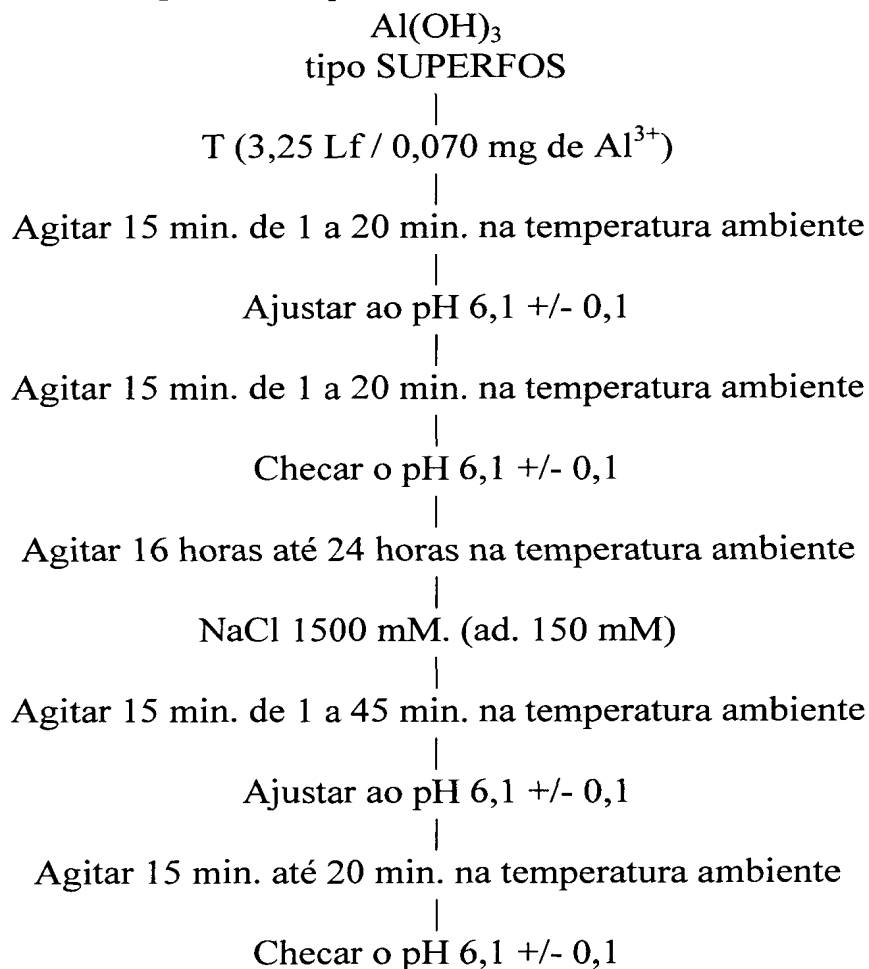
- 10 Para todas as formulações do Exemplo 1, os antígenos são absorvidos pela adição de sal de alumínio antes da formulação exceto IPV que é adicionado sem absorção.

As tabelas abaixo apresentam o método de absorção para D, T, Pw e HBsAg.



COMPOSIÇÃO FINAL por dose	
Difteria	7,5 Lf (+/- 420 Lf/ml)
Al ³⁺	0,075 mg
NaCl	150 mM
pH	6,1 +/- 0,1
Volume	aproximadamente 18 µl

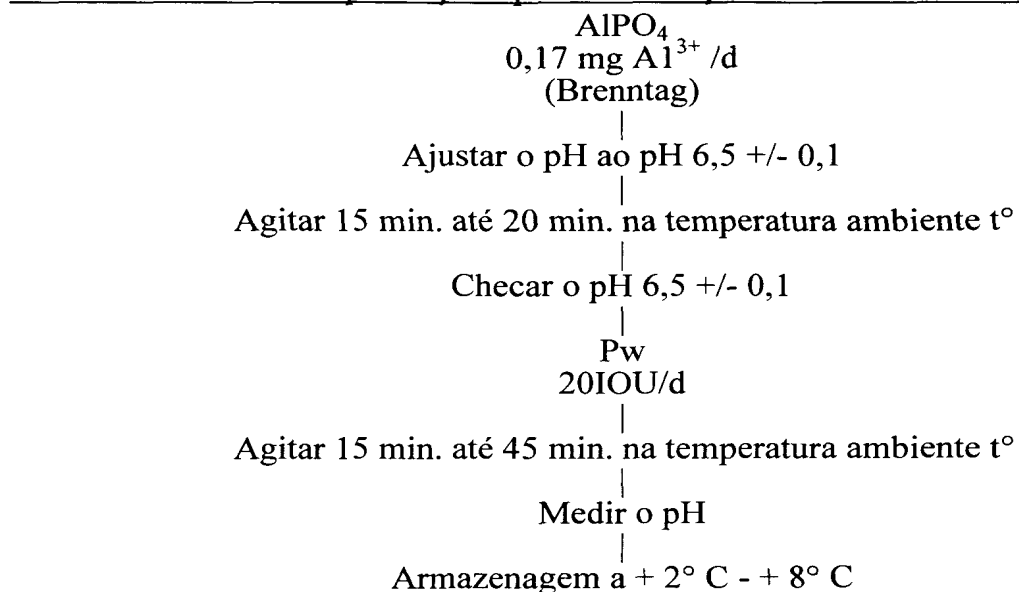
Tabela 1. Método de produções para a absorção do toxóide da difteria.



Armazenar por um mínimo de 14 dias a +2° C / +8° C° antes da formulação.

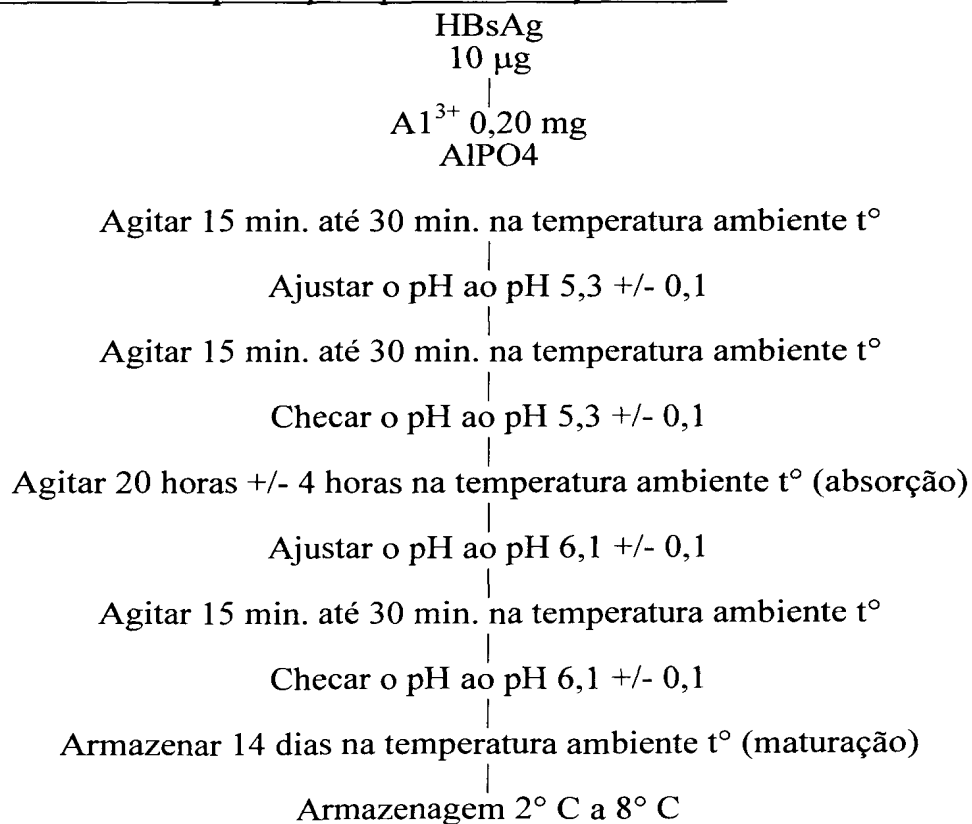
COMPOSIÇÃO FINAL por dose	
Tétano	3,25 Lf (+/- 360 Lf/ml)
Al ³⁺	0,070 mg
NaCl	150 mM
pH	6,1 +/- 0,1
Volume	aproximadamente 9 µl

Tabela 2. Método de produções para a absorção do toxóide do tétano.



COMPOSIÇÃO FINAL por dose			
Antígenos		Adjuvante	$[\text{Al}^{3+}]$ (mg)
Pw	20 OU	AlPO_4	0,170 mg
Al^{3+}	0,170 mg	AlPO_4	
NaCl	150 mM		
pH	6,8		
Volume	aproximadamente 65 μl		

Tabela 3. Método de produções para a absorção de Pw



COMPOSIÇÃO FINAL por dose			
Antígenos		Adjuvante	[Al ³⁺] (mg)
HBsAg	10 µg	AlPO ₄	0,200 mg
Al ³⁺	0,200 mg	AlPO ₄	
NaCl	150 mM		
pH	6,1 ± 0,1		
Volume	aproximadamente 50 µl		

Tabela 4. Método de produções para a absorção de HBsAg

Várias formulações diferentes foram testadas:

- Uma combinação de toxóide da difteria, toxóide do tétano, célula inteira da coqueluche e antígeno de superfície da Hepatite B : DTPw_{SF}-HB como uma referência (DTPw_{SF} significa que o mesmo é uma formulação isenta de tiomersal), formulados com o método de produção 1 (tabela 5).
- GlaxoSmithKline Biologicals S.A. produto Poliorix® (IPV autônomo não absorvido) como referência de não absorvido na dose padrão, formulado com o método de produção 2 (tabela 5).
- Uma combinação de toxóide da difteria, toxóide do tétano, célula inteira da coqueluche, antígeno de superfície da Hepatite B e vírus da pólio inativado: DTPw_{SF}-HB-IPV com a adição do IPV antes do Pw, formulados com o método de produção 3 (tabela 5).
- Uma combinação de toxóide da difteria, toxóide do tétano, célula inteira da coqueluche, antígeno de superfície da Hepatite B e vírus da pólio inativado: DTPw_{SF}-HB-IPV com a adição do IPV exatamente depois de T absorvido. este método de adição permite a absorção de IPV em Al(OH)₃. Esta vacina é formulada com o método de produção 4 (tabela 5).

Um placebo contendo apenas sais de alumínio, IPV e tampões dos outros antígenos. Como IPV é o único antígeno neste placebo, não há nenhuma competição quanto a absorção. Portanto, IPV é completamente absorvido. Esta vacina é formulada com o método de produção 5 (tabela 5).

As vacinas formuladas com os métodos de produção 2, 3, 4 e 5 foram produzidas com uma faixa de dose de IPV entre 12,5 % e 100 % da

dose de IPV padrão de 40/8/32 IU/0,5 ml.

Etapa	Método de produção 1 : DTPwsF-HB
1	Água para injeção para atingir um volume de dose final de 0,5 ml
2	Adicionar NaCl 1,5 M para atingir uma concentração final de 150 mM
3	Adicionar 115 µg de Al ³⁺ como AlPO ₄
4	Adicionar 10 µg de HBsAg absorvido
5	Adicionar 7,5 Lf de toxóide da difteria absorvido
6	Adicionar 3,25 Lf de toxóide do tétano absorvido
7	Agitar
8	Ajustar o pH ao 6,5 +/- 0,1
9	Agitar
10	Adicionar 20 IOU de Pw absorvido
11	Agitar
12	Armazenar de +2 a +8° C

EtapaMétodo de produção 2: IPV autônomo		
1 Adicionar IPV em uma dose de		
Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
40 IU	8 IU	32 IU
20 IU	4 IU	16 IU
10 IU	2 IU	8 IU
5 IU	1 IU	4 IU
2 Adicionar tampão M199 para atingir um volume final de 0,5 ml		
9 Agitar		
10 Ajustar o pH ao 6,9 +/- 0,2		
14 Armazenar a +2 to +8° C		

Etapa	Método de produção 3: DTPwsF-HB-IPV		
1	Água para injeção para atingir um volume de dose final de 0,5 ml		
2	Adicionar NaCl 1,5 M para atingir uma concentração final de 150 mM		
3	Adicionar 115 µg de Al ³⁺ como AlPO ₄		
4	Adicionar 10 µg de HBsAg absorvido		
5	Adicionar 7,5 Lf de toxóide da difteria absorvido		
6	Adicionar 3,25 Lf de toxóide do tétano absorvido		
7	Agitar		
8	Adicionar IPV em uma dose de		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
	40 IU	8 IU	32 IU
	20 IU	4 IU	16 IU
	10 IU	2 IU	8 IU
	5 IU	1 IU	4 IU
9	Agitar		
10	Ajustar o pH a 6,5 +/- 0,1		
11	Agitar		
12	Adicionar 20 IOU de Pw absorvido		
13	Agitar		
14	Armazenar de +2 a +8° C		

Método de produção 4 : DTPwsF-HB-IPV																
1	Água para injeção para atingir um volume de dose final de 0,5 ml															
2	Adicionar NaCl 1,5 M para atingir uma concentração final de 150 mM															
3	Adicionar 3,25 Lf de toxóide do tétano absorvido															
4	Adicionar IPV em uma dose de															
	<table><tr><th>Tipo 1</th><th>Tipo 2</th><th>Tipo 3</th></tr><tr><td>40 IU</td><td>8 IU</td><td>32 IU</td></tr><tr><td>20 IU</td><td>4 IU</td><td>16 IU</td></tr><tr><td>10 IU</td><td>2 IU</td><td>8 IU</td></tr><tr><td>5 IU</td><td>1 IU</td><td>4 IU</td></tr></table>	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	40 IU	8 IU	32 IU	20 IU	4 IU	16 IU	10 IU	2 IU	8 IU	5 IU	1 IU	4 IU
Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3														
40 IU	8 IU	32 IU														
20 IU	4 IU	16 IU														
10 IU	2 IU	8 IU														
5 IU	1 IU	4 IU														
5	Agitar															
6	Adicionar 115 µg de Al ³⁺ como AlPO ₄															
7	Adicionar 10 µg de HBsAg absorvido															
8	Adicionar 7,5 Lf de toxóide da difteria absorvido															
9	Agitar															
10	Ajustar o pH a 6,5 +/- 0,1															
11	Agitar															
12	Adicionar 20 IOU de Pw absorvido															
13	Agitar															
14	Armazenar de +2 a +8° C															
Método de produção 5: Placebo																
Como para o Método de produção 3, entretanto todos os antígenos outros que não IPV foram omitidos.																

Tabela 5. Método de produções para dose de 0,5 ml

Para o método de produção da formulação 1: HBsAg, D e T são absorvidos separadamente em AlPO₄, AlPO₄ e Al(OH)₃ respectivamente. Os três antígenos são sequencialmente adicionados a uma suspensão contendo água, NaCl e AlPO₄ livre. A mistura é agitada por 60-75 min. Depois o pH é ajustado a 6,5 antes da adição de Pw absorvido.

Para o método de produção da formulação 3, os três antígenos absorvidos são sequencialmente adicionados a uma suspensão contendo água, NaCl e AlPO₄ livre. A mistura é agitada por 60 a 75 min antes da adição de IPV. O pH é ajustado a 6,5 antes da adição de antígenos Pw.

Para o método de produção da formulação 4, o antígeno T é absorvido em Al(OH)₃. O antígeno T pré absorvido é adicionado a uma suspensão contendo água e NaCl, seguido por IPV tipos 1, 2 e 3. A mistura é agitada por 60 a 75 minutos antes da adição de AlPO₄ livre. HBsAg pré-absorvido é depois adicionado, seguido pelo antígeno D pré-absorvido e a mistura é depois agitada por um adicional de 60 a 75 minutos. O pH é ajustado a 6,5 antes da adição dos antígenos Pw.

O método de produção 3 foi eventualmente selecionado devido à facilidade de fabricação visto que este protocolo envolveu apenas uma etapa de agitação. Durante o processo de fabricação da vacina, tiomersal não é usado e não é adicionado ao produto de vacina final.

A tabela abaixo apresenta a composição das formulações para uma dose de 0,5 ml.

Descrição	Al ³⁺ como AlPO ₄ para a absorção de D	Al ³⁺ como Al(OH) ₃ para a absorção de D	Al ³⁺ como Al(OH) ₃ para a absorção de HBsAg	Al ³⁺ como Al(OH) ₃ para a absorção de Pw	AlPO ₄ livre	Al(OH) ₃ livre	Dose do toxóide da difteria	Dose do toxóide do tétano	Dose da coqueluche	Dose de HBsAg	Dose de IPV	
											% de dose padrão	Unidades de antígeno D (*) (T1/T2/T3)
Método de produção 1 DTPwsF-HB	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7,5 Lf	3,25 Lf	20 IOU	10 µg	NA	NA
Método de produção 2 IPV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100 % 50 % 25 % 12,50 %	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Método de produção 3 DTPwsF-HB-IPV	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7,5 Lf	3,25 Lf	20 IOU	10 µg	100 % 50 % 25 % 12,50 %	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Método de produção 4 DTPwsF-HB-IPV	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7,5 Lf	3,25 Lf	20 IOU	10 µg	100 % 50 % 25 % 12,50 %	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Método de produção 5 Placebo	NA	NA	NA	NA	560 µg	70 µg	NA	NA	NA	NA	100 % 50 % 25 % 12,50 %	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4

(*) O teor de antígeno D é o valor alvejado para a diluição do volume de pólio inativado concentrado durante a formulação

Tabela 6. Composição de formulações por dose de 0,5 ml

Determinação da potência da pólio em ratos pela soroneutralização

A potência da vacina foi determinada por um teste de soroneutralização depois da inoculação intramuscular de ratos (Sprague-Dawley (OFA) ou qualquer cepa validada de antemão). Grupos de 10 ratos saudáveis ingênuos foram inoculados intramuscularmente (0,5 ml) com diluições das amostras de teste, material de referência em solução salina tamponada com fosfato ou diluente (solução salina tamponada com fosfato). Depois dez ratos inoculados com o diluente foram usados como controles negativos. Vinte a vinte e dois dias depois da inoculação (período de imunização), cada animal foi profundamente anestesiado antes da coleta de sangue pela punção cardíaca. As amostras de sangue foram centrifugadas (a aproximadamente 800 g) e os soros foram avaliados.

Teste de Soroneutralização:

Os soros foram inativados pela incubação a 56° C por 30 minutos. Três séries de diluição dos soros, uma para cada tipo de pólio, foram preparadas em microplacas usando o meio de diluição apropriado. Para os três tipos de vírus da pólio, uma quantidade predeterminada de vírus foi adicionada às diluições séricas. As três suspensões virais foram diluídas levando-se em conta os seus respectivos títulos. A diluição final é chamada de 'diluição de trabalho'. Cada diluição de trabalho foi adicionada às microplacas correspondentes. As placas foram depois seladas e incubadas a 37° C $\pm$ 1° C por 16 horas. Células Hep-2 foram depois adicionadas e as microplacas foram incubadas a 37° C $\pm$ 1° C por 7 dias. O efeito citopatogênico (CPE) do vírus foi lido usando um microscópio invertido depois da coloração com azul de Coomassie.

A presença de anticorpos anti-poliomielite inibe o crescimento do vírus e o aparecimento do CPE correspondente. Os títulos virais anti-pólio (tipo 1, 2 e 3) correspondem à recíproca da última diluição sem qualquer CPE.

Em cada grupo, os animais com anticorpos neutralizadores são registrados e o títulos de anticorpo de cada amostra sérica é determinado para os diferentes tipos de poliovírus. O título do anticorpo neutralizador é expressado como o log2 da inversa da diluição mais alta da amostra sérica que totalmente inibe o efeito citopático das células do poliovírus em Hep-2. O título médio geométrico por diluição (GMT) e por tipo de vírus é depois determinado para cada grupo de ratos.

Para cada tipo de vírus, a diluição de vacina e subsequentemente a quantidade de antígeno D que induziu os anticorpos neutralizadores em 50 % dos ratos (ED50) também foi calculada pela análise probit. A ED50 foi expressada em unidades de antígeno D.

De modo a quantificar a potência em relação àquela da vacina de referência (usualmente Poliorix®, mas pode ser uma vacina de DTPaHBIPV tal como Pediarix®), a potência relativa (RP) definida como a razão de duas respostas de dose equivalentes em um teste de dose múltipla foi medida. Neste método, a potência da vacina de teste é calculada pelo ensaio de linha paralela como descrito em Finney, 1978 (Statistical Method in Biological Assay, Charles Griffin & Company Ltd, Londres, 1978).

Determinação da potência da pólio Tipo 1, 2 e 3 pelo ELISA

A determinação da potência da pólio pelo ELISA é realizada em uma ou duas etapas dependendo se a medição está sendo realizada no todo do IPV não absorvido vs vacinas formuladas respectivamente:

1. Dessorção para a vacina absorvida final (para medir unidades de antígeno D em vacinas formuladas – não requerida para a medição no todo do antígeno de IPV não absorvido);

- 2, O teste de ELISA para a quantificação do teor de antígeno D de vacina dessorvida e não absorvida e/ou pólio volumoso

Etapa de Dessorção

Depois da centrifugação por 10 minutos da vacina absorvida

sob teste, três dessorções sucessivas são realizadas, pela adição de um tampão de fosfato de desabsorção às pelotas, misturando e incubando na temperatura ambiente. O primeiro e o segundo períodos de desabsorção são de 2 horas, o período de incubação para a terceira extração sendo uma noite na temperatura ambiente. As colheitas das três extrações são reunidas e diluídas com solução tampão de fosfato (PBS) sem Ca e Mg contendo albumina sérica bovina (BSA) e Tween 20.

Os três antígenos do poliovírus são quantificados pelo ELISA como descrito abaixo.

10 Quantificação de antígeno D pelo ELISA:

As placas microtituladoras são revestidas com IgG anti-vírus da pólio de coelho específica (tipo 1, 2 ou 3), diluída com tampão de carbonato/bicarbonato (pH 9,6) e incubado durante a noite a 4° C. Depois da lavagem, a solução de saturação (solução salina tamponada com fosfato w/o Ca e Mg + 1 % de BSA) é adicionada. Os brancos (PBS) e as diluições em série das amostras de vacina e padrão não absorvido feito em casa são adicionadas em duplicata. A preparação do padrão trivalente feito em casa contém antígenos tipo 1, 2 e 3 calibrados. O calibrador é a referência do European Pharmacopoeia Biological (EPBRP).

20 Para todas as etapas seguintes, as placas microtituladoras são incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37° C e lavadas. A IgG anti-vírus da pólio de coelho (tipo 1, 2 ou 3) conjugado à peroxidase, diluída com tampão de fosfato (w/o Ca e Mg + Tween 20) contendo BSA, é adicionada. A solução de substrato, contendo a tetrametilbenzidina dissolvida em sulfóxido de dimetila (DMSO) e diluída em tampão de acetato contendo 0,003 % de H₂O₂,
25 é adicionada, seguida por uma incubação de 15 a 30 minutos no escuro. A solução de bloqueio, contendo H₂SO₄, é depois adicionada. Dentro de uma hora a densidade óptica (O.D.) de cada reservatório é lida usando um fotômetro ajustado a 450 nm com uma referência em 620 nm.

A concentração do antígeno D nas amostras de teste é calculada a partir da curva padrão obtida plotando-se os valores de O.D. contra as concentrações de antígeno padrão.

Como um suplemento para a potência pelo ELISA, qualquer antígeno de IPV não absorvido pode ser detectado pelo integralidade do método:

Integralidade de absorção para o Pólio Tipo 1, 2 e 3 não ligado a adjuvante pelo Elisa

Duas centrifugações sucessivas são realizadas. O sobrenadante é depois colhido e testado não diluído em duplicata nas microplacas pelo ELISA. As placas microtituladoras são revestidas com IgG anti-vírus da pólio de coelho específica (tipo 1, 2 ou 3), diluída com tampão de carbonato/bicarbonato (pH 9,6) e incubadas durante a noite a 4° C. Depois da lavagem, a solução de saturação (solução salina tamponada com fosfato w/o Ca e Mg + 1 % de BSA) é adicionada. Os brancos (PBS), o sobrenadante e o padrão não absorvido feito em casa são adicionados em duplicata.

Para todas as etapas seguintes, as placas microtituladoras são incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37° C e lavadas. A IgG anti-vírus da pólio (tipo 1, 2 ou 3) de coelho conjugada à peroxidase, diluída com tampão de fosfato (w/o Ca e Mg + Tween 20) contendo BSA, é adicionada. A solução de substrato, contendo a tetrametilbenzidina dissolvida em sulfóxido de dimetila (DMSO) e diluída em tampão de acetato contendo 0,003 % de H₂O₂, é adicionada, seguida por uma incubação de 15 a 30 minutos no escuro. A solução de bloqueio, contendo H₂SO₄, é depois adicionada. Dentro de uma hora a densidade óptica (O.D.) de cada reservatório é lida usando um fotômetro ajustado a 450 nm com uma referência em 620 nm.

A integralidade é considerada positiva (antígeno no sobrenadante) se a OD média da amostra é mais alta do que os valores da OD

média de brancos + 3 desvios padrão e se a OD média da amostra é mais alta do que 0,1.

No caso de integralidade positiva, o teor de antígeno é medido pelo método de ELISA como descrito na segunda etapa da Potência do Pólio Tipo 1, 2 e 3 pelo ELISA.

Método de medir a Unidade de Opacidade Internacional (IOU)

A concentração de célula (IOU) pode ser determinada usando a solução padrão de IRPO visual (Preparação de Referência Internacional de Opacidade) ou pela medição pela absorbância a 660 nm.

A opacidade da Suspensão de Cepa Única é depois determinada aplicando-se a equação de “opacidade designada” como segue:

$$AO = LO/KO \times CO;$$

onde AO = opacidade designada, LO = opacidade colhida viva, KO = opacidade colhida morta e CO = opacidade concentrada.

RESULTADO

Determinação da potência da pólio em ratos pela soroneutralização na dose de 40:8:32 padrão

Experimentos foram realizados para determinar a potência de IPV tipos 1, 2 e 3. Os resultados são mostrados na Tabela 8 abaixo (no presente documento, 40:8:32 unidades de antígeno D de IPV tipos 1, 2 e 3 respectivamente é equivalente a 100 % da dose de IPV).

Descrição	Potência de IPV (ED50 expressada em IU/dose)		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Ref. Poliorix	20,78	8,88	40,02
Ref. DTPaHBIPV	3,21	0,57	8,62
DTPw _{SF} -HB-IPV	<1,93	0,64	<2,57
Método de produção 3			

Tabela 8. Potência de IPV tipos 1, 2 e 3 em três formulações de vacina diferentes.

A formulação DTP_{w_{sf}}-HB-IPV (100 % de IPV) apresenta potências de IPV melhores do que a referência Poliorix e similar ou melhor do que a referência DTPaHBIPV.

Avaliação da potência do IPV com dosagens de IPV reduzidas

A potência é medida pelos métodos in vitro e in vivo descritos acima.

A potência pelo Elisa da dose reduzida de IPV para ambas as formulações dos métodos de produção 3 e 4 foi examinada in vitro e comparada com a DTPaIPVHB de referência como mostrado na Tabela 9. Dois lotes para cada formulação foram testados para o método de produção 3.

A percentagem de recuperação foi calculada com respeito ao teor de antígeno tomado do todo do IPV para cada formulação (por exemplo, 40/8/32 por formulação contendo 100 % de IPV; 20/8/16 por formulação contendo 50 % de IPV; 10/4/8 para formulação contendo 25 % de IPV; 5/2/4 para formulação contendo 12,5 % de IPV)

Amostra	T1		T2		T3	
	Potência da Pólio (% de recuperação)	Conclusão (% de recuperação)	Potência da Pólio (% de recuperação)	Conclusão (% de recuperação)	Potência da Pólio (% de recuperação)	conclusão (% de recuperação)
DTPaIPVHB Referência	82 %	NP	99 %	NP	93 %	NP
DTPwSF-HB-IPV 1 “Método de produção 3” 100 % de IPV	46 %	47 %	94 %	< 5 %	24 %	74 %
DTPwSF-HB-IPV 2 “Método de produção 3” 100 % de IPV	80 %	< 5 %	100 %	< 5,0 %	81 %	17 %
DTPwSF-HB-IPV 1 “Método de produção 3” 50 % de IPV	48 %	31 %	98 %	< 5 %	29 %	64 %
DTPwSF-HB-IPV 2 “Método de produção 3” 50 % de IPV	71 %	< 5 %	99 %	< 5 %	91 %	> 5 %
DTPwSF-HB-IPV 1 “Método de produção 3” 25 % de IPV	54 %	34 %	115 %	< 5 %	33 %	71 %
DTPwSF-HB-IPV 2 “Método de produção 3” 25 % de IPV	81 %	< 5 %	115 %	< 5 %	107 %	< 5 %
DTPwSF-HB-IPV “Método de produção 3” 12,5 % de IPV	50 %	24 %	110 %	< 5 %	28 %	60 %
DTPwSF-HB-IPV “Método de produção 4” 100 % de IPV	41 %	48 %	93 %	< 5 %	23 %	51 %
DTPwSF-HB-IPV “Método de produção 4” 50 % de IPV	47 %	37 %	98 %	< 5 %	28 %	69 %
DTPwSF-HB-IPV “Método de produção 4” 25 % de IPV	51 %	28 %	80 %	< 5 %	33 %	61 %
DTPwSF-HB-IPV “Método de produção 4” 12,5 % de IPV	42 %	22 %	100 %	< 5 %	40 %	58 %
Placebo “Método de produção 5” 100 % de IPV	86 %	< 5 %	98 %	< 5 %	107 %	< 5 %
Placebo “Método de produção 5” 50 % de IPV	94 %	< 5 %	110 %	< 5 %	111 %	< 5 %
Placebo “Método de produção 5” 25 % de IPV	80 %	< 5 %	100 %	< 5 %	104 %	< 5 %
Placebo “Método de produção 5” 12,5 % de IPV	72 %	< 5 %	100 %	< 5 %	98 %	< 5 %

Tabela 9

A Tabela 9 mostra que a integralidade da absorção é similar para todas as doses de IPV. O Tipo 1 e Tipo 3 são fortemente dessorvido (17 % a 74 %) enquanto que o Tipo 2 permanece bem absorvido. Os três tipos são bem absorvidos para a formulação de placebo para todas as doses de IPV. A absorção é similar como para a vacina de referência de DTPaIPVHB.

Existe uma variabilidade na integralidade do IPV por causa do fato de que o método de quantificação da integralidade não é validado nem para formulações de IPV DTPwHB nem para concentrações de IPV mais baixas (< 40/8/32 Unidades de antígeno D /0,5 ml).

A potência relativa (expressada em comparação com a vacina poliorix de referência) da dose reduzida de IPV para ambas as formulações de métodos de produção 3 e 4 foi examinada in vivo em comparação com formulações de referência como mostrado nas Figuras 1 e 2. Dois lotes para cada formulação foram testados para o método de produção 3.

A Figura 1 mostra que a potência do IPV de DTPwSF-HB-IPV com 100 % de IPV é levemente maior do que a potência de IPV em DTPaHBIPV. A potência do IPV de DTPwSF-HBIPV 50 % da formulação do método de produção 3 pode ser observada ser similar a 100 % de DTPaHBIPV. A potência do IPV para DTPwSF-HB-IPV 25 % do método de produção 3 é levemente mais baixas do que para Poliorix®. Também foi descoberto que 12,5 % da dose de IPV não foi suficiente para se obter uma boa potência do IPV.

A Figura 2 mostra que a potência do IPV é similar para a formulação do método de produção 3 e a formulação do método de produção 4. Também é mostrado que existe uma tendência de melhor potência para o placebo do que para DTPwSF-HB-IPV.

Estes dados portanto confirmam que uma dose de IPV reduzida é suficiente para se obter uma boa potência in vivo.

Exemplo 2: Praticabilidade de não usar nenhum tiomersal nas vacinas da invenção

O Teste de Eficácia de Conservante (PET) permite a demonstração da atividade antimicrobiana da vacina testada. O teste consiste em:

- inocular a preparação de vacina, na sua etapa de receptor final, com um inóculo prescrito de micro-organismos adequados,
- armazenar a preparação inoculada em uma temperatura prescrita
- retirar amostras do receptor em intervalos especificados de tempo e contagem dos organismos nas amostras tomadas.

O procedimento de teste de PET é descrito na European Pharmacopoeia (5.1.3) e no USP (<51>). De acordo com estas diretrizes, a atividade antimicrobiana é avaliada pela comparação da redução no número de micro-organismos viáveis com os critérios mencionados na seguinte tabela (Tabela 7)

Microorganismos	Tempo	Critérios : redução log			
		EP A	EP B	EP C	USP
<u>Bactérias</u>					
Staphilococcus aureus	6h	2			
Escherichia coli	d1	3	1	Ni*	
Pseudomonas aeruginosa	d7		3	Ni*	1
	d14	Nr*	Ni*	3	3
	d28			Ni*	Ni*
<u>Levedura e mofos</u>					
Candida albicans	d7	2			Ni*
Aspergillus niger	d14		1	Ni*	Ni*
	d28	Ni*	Ni*	Ni*	Ni*

Tabela 7. Critérios EP e USP

Nr* : não recuperado

Ni* : não aumentado

Exemplo 3: Efeito do componente Hib na potência de IPV e estabilidade de IPV com o tempo

A Potência Relativa de IPV foi medida como descrito no Exemplo 1 para determinar quais efeitos o componente de Hib pode ter sobre a potência do IPV e para avaliar a estabilidade de IPV com o tempo em doses diferentes de IPV. As vacinas investigadas foram DTPwHBIPV (40-8-32), DTPwHBIPV com Hib reconstituído e armazenado por 8 meses, DTPwHBIPV (20-4-16), DTPwHBIPV (20-4-16) com Hib reconstituído e armazenado por 8 meses, DTPwHBIPV (20-4-16) e armazenado por 8 meses, DTPwHBIPV (10-2-8) e DTPwHBIPV (10-2-8) com Hib reconstituído e armazenado por 8 meses. Os valores de RP foram medidos em relação à DTPaIPVHB (Pediarix) (Figura 3a) ou Poliorix (Figura 3b). Foi descoberto que o componente Hib não tem nenhum impacto sobre a potência do IPV. A potência relativa de IPV foi descoberta ser mantida por 8 meses (Figura 3).

Exemplo 4: Efeito da proporção de $\text{AlPO}_4/\text{Al}(\text{OH})_3$ sobre o aspecto visual, da absorção de D e T e da potência de IPV

As formulações foram realizadas com mudança da composição de alumínio.

As formulações de DTPw_{SF}-HB-IPV usualmente contêm 630 µg de Alumínio: 560 µg de Al^{3+} como AlPO_4 , 70 µg de Al^{3+} como $\text{Al}(\text{OH})_3$. Sais de alumínio são usados para absorver D, T, Pw e HBsAg. 115 µg de Al^{3+} de AlPO_4 livre são adicionados durante a formulação.

As formulações foram realizadas com as seguintes proporções de Al^{3+} livre:

	$\text{Al}(\text{OH})_3$ µg de Al^{3+}	AlPO_4 µg de Al^{3+}
Lote 1	0	115
Lote 2	23	92
Lote 3	69	46
Lote 4	46	69
Lote 5	92	23
Lote 6	115	0

Tabela 10. Proporção de $\text{AlPO}_4/\text{Al}(\text{OH})_3$

Etapa	Método de produção 3: DTPwsF-HB-IPV
1	Água para injeção para atingir um volume de dose final de 0,5 ml
2	Adicionar NaCl 1,5 M para atingir uma concentração final de 150 mM
3	Adicionar 115 μg de Al^{3+} com proporções diferentes de $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{AlPO}_4$
4	Adicionar 10 μg de HBsAg absorvido
5	Adicionar 7,5 Lf de toxóide da difteria absorvido
6	Adicionar 3,25 Lf de toxóide do tétano absorvido
7	Agitar
8	Adicionar IPV em uma dose de 40/8/32 IU
9	Agitar
10	Ajustar o pH a 6,5 +/- 0,1
11	Agitar
12	Adicionar 20 IOU de Pw absorvido
13	Agitar
14	Armazenar de +2 a +8° C

Tabela 11. Método de produção para DTPwHB-IPV

O aspecto visual foi observado e até a razão de 69/46, agregação aceitável é obtida.

5 As formulações foram realizadas com o mesmo método de produção e uma faixa de dose para IPV entre 0 e 100 % da dose de IPV regular.

A porcentagem de absorção dos toxóides D e T foi medida pelo ELISA. A estabilidade da absorção foi seguida por um tratamento de 7 dias a 37° C. Os resultados são apresentados nas Tabelas 12 e 14.

10

		Proporção de Al(OH) ₃ /AlPO ₄					
	dose de IPV	0/115		23/92		46/69	
		T0	7D 37 °C	T0	7D 37 °C	T0	7D 37 °C
Pw _{sf}	0 %	<1%	25%	<1%	6%	/	
	25 %	<1%	29%	<1%	15%	<1%	5%
	50 %	3%	41%	<1%	26%	<1%	17%
	75 %	4%	49%	<1%	23%	<1%	11%

Tabela 12. Porcentagem de D toxóide desabsorção em DTPwHB-IPV com a faixa de dose de IPV

	dose de IPV	Proporção de $\text{Al(OH)}_3/\text{AlPO}_4$					
		0/115		23/92		46/69	
		T0	7D 37 °C	T0	7D 37 °C	T0	7D 37 °C
Pw_{sf}	0 %	<1%	34%	<1%	12%	/	
	25 %	<1%	50%	<1%	32%	<1%	12%
	50 %	5%	61%	<1%	51%	<1%	33%
	100 %	8%	63%	<1%	41%	<1%	29%

Tabela 13. Porcentagem de desabsorção do toxóide T em DTPwHB-IPV com a faixa de dose de IPV

5 A absorção do IPV foi seguida. A estabilidade da absorção foi seguida por um tratamento de 21 dias a 25° C.

dose de IPV		Estimativa de Ag não absorvido					
		Proporção de $\text{Al(OH)}_3/\text{AlPO}_4$					
		0/115		23/92		46/69	
Dose	Tipo	T0	21 25 °C	T0	21 25 °C	T0	21 25 °C
0 %		N/A	N/A	N/A	N/A	AGREGAÇÃO	
25 %	Tipo 1	~10-20%	~20-30%	~10-20%	~20-30%	<10%	~20-30%
	Tipo 2	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%
	Tipo 3	>30%	>30%	~20-30%	>30%	<10%	>30%
50 %	Tipo 1	>30%	>30%	~10-20%	>30%	~10-20%	>30%
	Tipo 2	~10-20	~10-20	<10%	<10%	~10-20%	<10%
	Tipo 3	>30%	>30%	~10-20%	>30%	~10-20%	>30%
100 %	Tipo 1	>30%	>30%	~10-20%	>30%	~10-20%	>30%
	Tipo 2	~10-20	~10-20	<10%	<10%	<10%	<10%
	Tipo 3	>30%	>30%	~20-30%	>30%	~10-20%	>30%

Tabela 14. Porcentagem de desabsorção de IPV em DTPwHB-IPV com a faixa de dose de IPV

10 O aumento do teor de Al(OH)_3 nas formulações permite uma melhora na absorção para D, T e IPV.

A melhor razão de absorção obtida foi com a proporção de $\text{Al(OH)}_3/\text{AlPO}_4$ de 46/69.

Nesta proporção:

15 ■ A absorção de T e D é completa em T0. A desabsorção depois de um estudo de estabilidade acelerada de 7 dias a 37° C apresenta < 20 % de desabsorção para D, < 30 % para T.

■ Cada tipo de IPV é absorvido. A desabsorção do Tipo 3

ocorre em 21 dias a 25° C.

As formulações com a proporção 46/69 foram testadas in vivo e comparadas com Tetravac, Poliorix e uma vacina DTPaIPV.

Amostra	ED50		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
DTPw-HB-IPV 100 %/HIB Proporção 46/69	< 1,93	< 0,64	2,57
DTPw-HB-IPV 50 %/HIB Proporção 46/69	< 1,59	0,46	< 1,67
DTPw-HB-IPV 25 %/HIB Proporção 46/69	3,08	0,96	3,25
Tetravac	8,53	0,39	9,15
Poliorix	9,52	2,64	15,06
DTPaHBIPV	< 5,18	< 0,64	15,01

Tabela 15. Resultados de potências in vivo

- 5 Não existe nenhuma diferença significativa (ED50) entre as formulações de DTPw-HB-IPV. DTPaHBIPV, Tetravac e Poliorix dão resultados similares, inferiores às formulações de DTPw-HB-IPV (exceto para o tipo 2 para o qual todas as formulações são equivalentes).

Exemplo 5: Avaliação clínica da vacina DTPw-HBV-IPV/Hib investigacional com dosagens de IPV reduzidas

Um estudo de praticabilidade de Fase II é planejado para avaliar a imunogenicidade, reatogenicidade e segurança de três formulações diferentes da vacina DTPwHBV-IPV/Hib investigacional da GSK Biologicals quando comparada com a DTPw-HBV/Hib comercial e vacinas de IPV administradas concomitantemente.

• Indicação/populações:

Imunização primária de crianças saudáveis na primeira semana de vida contra as doenças de difteria, tétano, coqueluche, hepatite B, poliomielite e Haemophilus influenzae tipo b.

Grupos de Estudo:

Vacina DTPw-HBV-IPV (dose padrão)/Hib

Vacina DTPw-HBV-IPV (49 % da dose padrão)/Hib

Vacina DTPw-HBV-IPV(26 % da dose padrão)/Hib

Vacinas DTPw-HBV/Hib + IPV

• Co-objetivos primários:

Os co-objetivos primários serão avaliados na maneira
5 sequencial: isto é o segundo e terceiro objetivos serão avaliados apenas se o
precedente foi atingido.

✓ Para demonstrar a não inferioridade da vacina DTPw-HBV-
IPV(dose padrão)/Hib em relação à vacina de IPV co-administrada com a
vacina DTPw-HBV/Hib em termos de resposta de anticorpo aos três tipos de
10 poliovírus, um mês depois do curso de vacinação primária.

O objetivo de não inferioridade será atingido se o limite
superior dos 95 % CI padronizados assintóticos na diferença entre grupos
(DTPwHBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (dose padrão)/Hib) em
termos de taxas de soroproteção para cada um dos três tipos de poliovírus é de
15 10 %.

✓ Para demonstrar a não inferioridade da vacina DTPw-HBV-
IPV (49 % da dose padrão)/Hib em relação á vacina de IPV co-administrada
com a vacina DTPw-HBV/Hib em termos de resposta de anticorpo aos três
tipos de poliovírus, um mês depois do curso de vacinação primária.

O objetivo de não inferioridade será atingido se o limite
superior dos 95 % CI padronizado assintótico sobre as diferenças entre grupos
(DTPwHBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (49 % da dose padrão)/Hib)
em termos de taxas de soroproteção para cada um dos três tipos de poliovírus
é de 10 %.

✓ Para demonstrar a não inferioridade da vacina DTPw-HBV-
IPV (26 % da dose padrão)/Hib em relação à vacina de IPV co-administrada
com a vacina DTPw-HBV/Hib em termos de resposta de anticorpo aos três
tipos de poliovírus, um mês depois do curso de vacinação primária.

O objetivo de não inferioridade será atingido se o limite

superior dos 95 % CI padronizados assintóticos nas diferenças entre grupos (DTPwHBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (26 % da dose padrão)/Hib) em termos de taxas de soroproteção para cada um dos três tipos de poliovírus é de 10 %.

5 • Objetivos secundários:

Imunogenicidade

Para avaliar a imunogenicidade a vacina candidata de DTPw-HBV-IPV/Hib em termos de resposta a todos os antígenos de vacina em comparação com o DTPw-HBV/Hib e vacinas de IPV co-administradas.

10 Reatogenicidade

Para avaliar a reatogenicidade e segurança das vacinas de estudo, em termos de sintomas solicitados, sintomas não solicitados e eventos adversos sérios.

• Programa de Vacinação

15 Três programas de vacinação de dose primária em 6, 10 e 14 semanas de idade. Todos os pacientes recebem uma dose ao nascer de Hepatite B.

• País:

Filipinas

20 • Amostragem de sangue:

Pré- e pós-vacinação 3

• Formulações de Vacina:

Vacina	Formulação/dose	Apresentação	Volume
DTPw-HBV-IPV/Hib da GSK Biologicals	toxóide da difteria: não menos do que 30 IU (7,5 Lf) toxóide do tétano: não menos do que 60 IU (3,25 Lf) Bordetella pertussis, morto: não menos do que 4 IU (20 OU) r-DNA HBsAg: 10 µg Alumínio como sais: 0,66 mg Poliovírus inativados tipo 1: 40 unidades de antígeno D Poliovírus inativados tipo 2: 8 unidades de antígeno D Poliovírus inativados tipo 3: 32 unidades de antígeno D	Líquido esbranquiçado em frascos de monodose	0,5 ml da vacina reconstituída
Componente de IPV (dose padrão)	49 % da dose padrão completa de IPV (40-8-32) 26 % da dose padrão completa de IPV (40-8-32)		
Componente de IPV (49 % da dose padrão)			
Componente de IPV (26 % da dose padrão)			
	Conjugado de polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b: 2,5 µg e toxóide do tétano: 5 a 10 µg Lactose: 12,6 mg Alumínio como sais: 30 µg	Pelota secada por congelamento em frascos de monodose	
DTPw-HBV/Hib (Zilbrix® Hib)	toxóide da difteria: não menos do que 30 IU (7,5 Lf) toxóide do tétano: não menos do que 60 IU (3,25 Lf) Bordetella pertussis, morta: não menos do que 4 IU (20 OU) r-DNA HBsAg: 10 µg Alumínio como sais: 0,66 mg Tiomersal: 8 µg	líquido esbranquiçado em frasco de duas doses	1 ml da vacina reconstituída
	Conjugado de polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b: 2,5 µg e toxóide do tétano: 5 a 10 µg Lactose: 12,6 mg Alumínio como sais: 30 µg	Pelota secada por congelamento em frascos de duas doses	
IPV da GSK Biologicals (Poliorix™)	Poliovírus inativados tipo 1: 40 unidades de antígeno D Poliovírus inativados tipo 2: 8 unidades de antígeno D Poliovírus inativados tipo 3: 32 unidades de antígeno D 2-fenoxietanol max 2,5 mg Polissorbato max 50 µg Formaldeído max 100 µg Solução salina tamponada com fosfato Contém aminoácidos para injeção q.s, ad 0,5 ml	Líquido esbranquiçado Em frascos de monodose	0,5 ml

Tabela 16. Formulações de Vacina

PRÉ-ABSORÇÃO DOS ANTÍGENOS

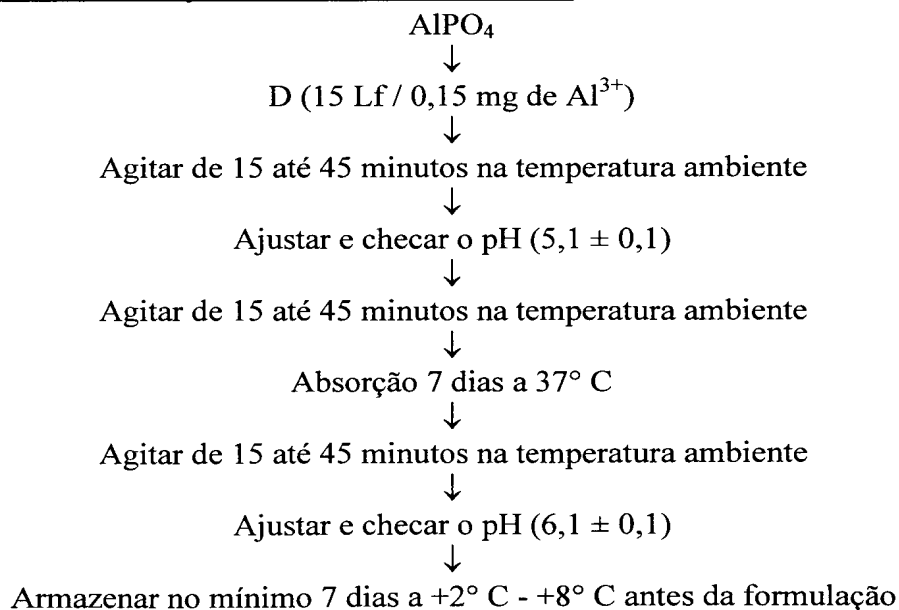
5 A formulação de DTPw-HBV-IPV combina toxóide da difteria, toxóide do tétano, três cepas de Bordetella pertussis, o antígeno de superfície maior purificado (HBsAg) do vírus da Hepatite B (HBV) e o vírus da pólio inativado (IPV). Estes antígenos, exceto o IPV, foram primeiro pré-

absorvidos em sal de alumínio antes de serem misturados com sal de alumínio, tampão de cloreto de sódio e água para injeção.

Absorção de toxóide da difteria

O concentrado purificado da difteria foi absorvido em fosfato de alumínio em uma proporção de 15 Lf de toxóide da difteria / 0,15 mg de Al^{3+} . Os dois componentes foram agitados por 15 até 45 minutos na temperatura ambiente. O pH foi ajustado ao pH $5,1 \pm 0,1$, seguido por agitação por 15 até 45 minutos. A mistura foi armazenada por uma semana a 37°C . Depois de agitar de 15 até 45 minutos na temperatura ambiente, o pH foi ajustado ao pH $6,1 \pm 0,1$. O concentrado absorvido foi armazenado a $+2^\circ \text{C}$ - $+8^\circ \text{C}$ por pelo menos 7 dias antes da formulação final da vacina de DTPw-HB-IPV. A Figura 1 a seguir destaca o processo de fabricação de absorção do grosso da Difteria pré-absorvida.

Fluxograma de Absorção de toxóide da difteria

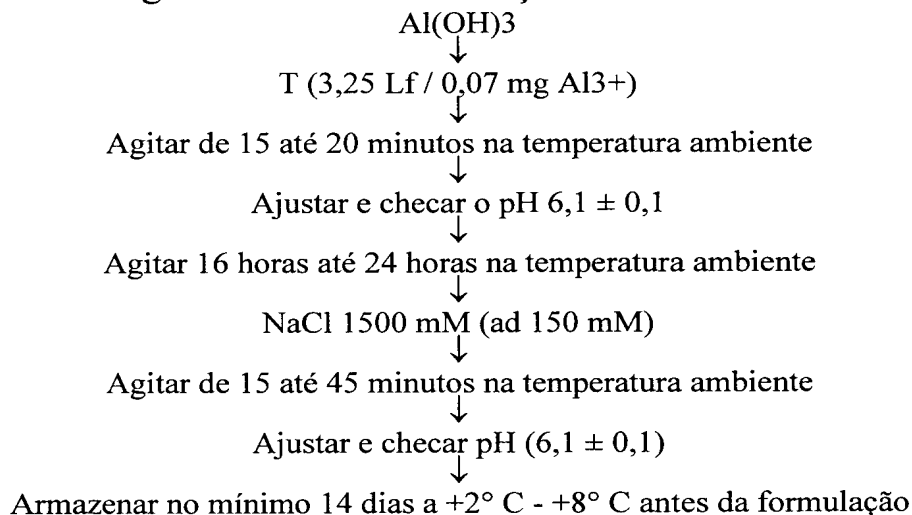


15 Absorção do toxóide do tétano

O concentrado do tétano foi absorvido em hidróxido de alumínio em uma proporção de 3,25 Lf / 0,07 mg de Al^{3+} . Os dois componentes foram agitados por 15 até 20 minutos. O pH foi ajustado no pH $6,1 \pm 0,1$. A mistura foi armazenada sob agitação por 16 até 24 horas na

temperatura ambiente. Uma solução de cloreto de sódio de 1500 mM de concentração nominal foi adicionada (ad 150 mM). Depois de agitar de 15 até 45 minutos na temperatura ambiente, o pH foi ajustado a $6,1 \pm 0,1$. O concentrado absorvido foi armazenado a $+2^{\circ}\text{C} - +8^{\circ}\text{C}$ por pelo menos 14 dias antes da formulação final de vacina de DTPw-HBV-IPV.

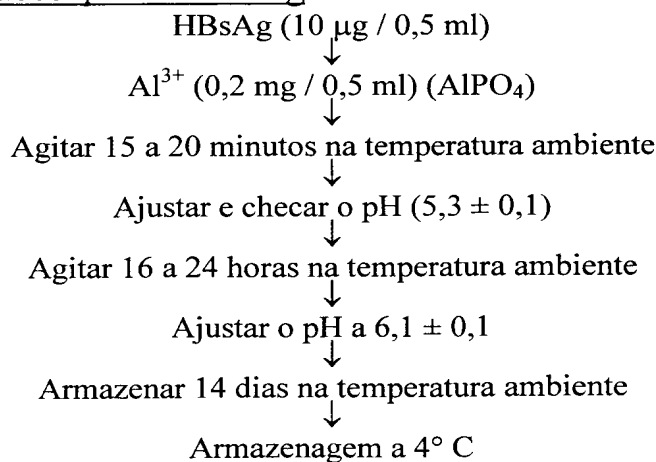
Diagrama de fluxo da absorção de toxóide do tétano



Absorção do antígeno da Hepatite B

O grosso do HBsAg purificado estéril foi misturado com uma suspensão estéril de fosfato de alumínio de modo a obter uma suspensão que contém por 10 μg de HBsAg, 0,2 mg de Al^{3+} (como fosfato de alumínio), 150 mM de NaCl em um volume final de cerca de 50 μl .

Procedimento de absorção de HBsAg



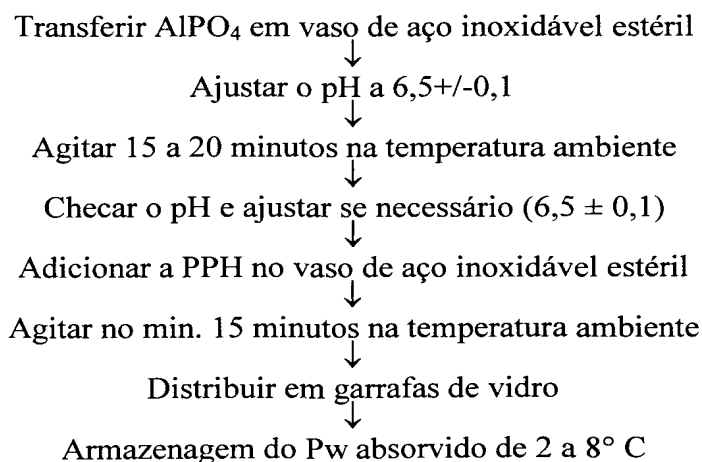
Absorção de antígeno Pw

A solução de AlPO_4 foi transferida assepticamente para um vaso estéril. A solução foi agitada por 5 a 10 minutos e o pH foi ajustado a 6,5 +/- 0,1 com HCl 1 M ou NaOH 0,5 M diretamente no vaso. A solução foi agitada por 15 a 20 minutos. O pH foi checado ($6,5 \pm 0,1$) e ajustado se necessário.

Antes da absorção, a colheita reunida da coqueluche (PPH) foi misturada por um mínimo de 15 minutos antes do uso e depois a PPH foi adicionada no vaso estéril contendo o AlPO_4 . A suspensão foi agitada por um mínimo de 15 minutos na temperatura ambiente e pôde ser armazenada durante a noite na temperatura ambiente. Se o produto foi armazenado durante a noite na temperatura ambiente, ele teve que ser recolocado em suspensão por um mínimo de 30 minutos antes da distribuição. As amostras foram tomadas para teste.

O grosso do Pw absorvido foi distribuído em garrafas de vidro estéreis e armazenado de 2 a 8° C.

Diagrama de fluxo da absorção de Pw



FORMULAÇÃO FINAL DE DTPW-HBV-IPV

O processo foi feito como segue:

- A solução de cloreto de sódio e água foram misturados para injeções de modo a obter uma concentração final de 150 mM de NaCl.

- AlPO_4 foi adicionado de modo a obter uma concentração de Al^{3+} livre de 0,115 mg/dose

- Os concentrados de HEF, difteria e tétano absorvidos foram adicionados de modo a obter uma concentração final de 10 μg de HBsAg, 7,5 Lf de toxóide da difteria e 3,25 Lf de toxóide do tétano por dose de 0,5 ml.

- IPV foi adicionado de modo a obter uma concentração final de 40/8/32 ou 19,6/3,9/15,7 ou 10,4/2,1/8,3 UI/d.

- Agitar suavemente por 60 até 120 minutos na temperatura ambiente.

10 - o pH foi ajustado a $6,5 \pm 0,1$

- Agitar por 15 até 20 minutos na temperatura ambiente.

- o pH foi checado: $6,5 \pm 0,1$

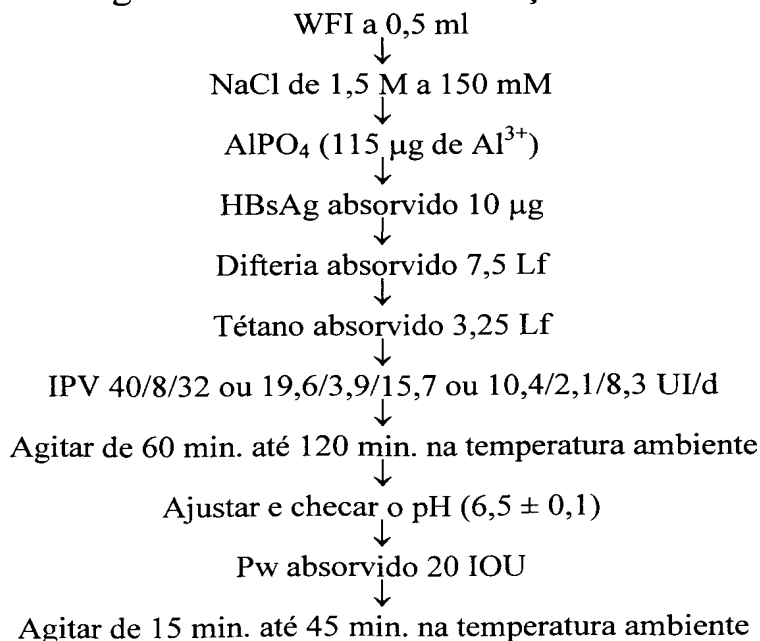
- o concentrado de Pw absorvido foi adicionado de modo a obter uma concentração final de 20 IOU por dose de 0,5 ml

15 - Agitar por 15 a 45 minutos na temperatura ambiente.

- o pH foi medido

- o grosso final foi armazenado entre $+2^\circ \text{C}$ e $+8^\circ \text{C}$ até o preenchimento.

Diagrama de fluxo da formulação de vacina DTPw-HBV



Exemplo 6: Avaliação clínica da vacina de DTPa-HBV-IPV/Hib investigacional com dosagens de Hib e IPV reduzidas

Um estudo de Fase II, exploratório é planejado para avaliar a imunogenicidade, reatogenicidade e segurança de 4 formulações diferentes da
 5 vacina DTPaHBV-IPV/Hib investigacional da GSK Biologicals versus a vacina DTPa-HBV-IPV/Hib comercial e as vacinas DTPw-HBV/Hib e IPV comerciais administradas concomitantemente.

• Indicação/populações:

a imunização primária de crianças saudáveis na primeira
 10 semana de vida contra as doenças de difteria, tétano, coqueluche, hepatite B, poliomielite e Haemophilus influenzae tipo b.

• Grupos de estudo:

Vacina DTPa-HBV-IPV (49 % da dose padrão)/Hib 5 µg
 Vacina DTPa-HBV-IPV (49 % da dose padrão)/Hib 2,5 µg
 15 Vacina DTPa-HBV-IPV (26 % da dose padrão)/Hib 5 µg
 Vacina DTPa-HBV-IPV (26 % da dose padrão)/Hib 2,5 µg
 Vacina DTPa-HBV-IPV/Hib
 Vacina DTPw-HBV/Hib + IPV

• Objetivos primários:

20 Para avaliar a imunogenicidade das vacinas candidatas DTPa-HBV-IPV/Hib em termos da resposta ao PRP e os três antígenos da pólio (pólio 1, 2 e 3).

• Objetivos secundários:

Imunogenicidade
 25 Para avaliar a imunogenicidade de todas as vacinas do estudo em termos de resposta para todos os antígenos de vacina.

Reatogenicidade

Para avaliar a reatogenicidade e segurança das vacinas estudo, em termos de sintomas solicitados, sintomas não solicitados e eventos

adversos sérios.

- Programa de Vacinação

O programa de vacinação primária de três doses como de 6 semanas de idade. Todos os pacientes recebem uma dose de Hepatite B no nascimento.

- País:

TBC

- Amostragem de sangue:

Pré e pós vacinação 3

- Formulações de Vacina:

A vacina é constituída de duas partes: uma parte de líquido (DTPa-HB-IPV) e uma parte secada por congelamento (Hib).

D, T, PT, FHA, PRN e HBsAg são preliminarmente pré-absorvidos. Água e NaCl são misturados com os antígenos diferentes. A mistura é agitada para homogeneizar e o pH é ajustado. A composição final da parte de DTPa-HB-IPV da vacina é apresentada na tabela a seguir.

Componente	Quantidade
Toxóide D	25 Lf
Toxóide T	10 Lf
PT	25 µg
FHA	25 µg
PRN	8 µg
HBsAg	10 µg
IPV tipo 1	40 ou 19,6 ou 10,4 IU
IPV tipo 2	8 ou 3,9 ou 2,1 IU
IPV tipo 3	32 ou 15,7 ou 8,3 IU
Al ³⁺	De 700 a 790 µg

Tabela 17. Composição para uma dose humana de 0,5 ml de DTPa-HBV-IPV

O Hib é pré-absorvido. O Hib pré-absorvido é misturado com sacarose ou lactose antes da secagem por congelamento. A quantidade de Hib será 2,5 ou 5 ou 10 µg por dose humana. O teor de alumínio será de 30 a 120 µg de Al³⁺ como AlPO₄ por dose humana

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina de IPV, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) toxóide da difteria;

(b) toxóide do tétano;

5 (c) célula integral morta de *Bordetella pertussis*, substancialmente isenta de tiomersal; ou dois ou mais componentes de *pertussis* acelulares (Pa) (por exemplo, toxóide de *pertussis* (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) e pertactina (PRN)), e;

10 (d) poliovírus inativados tipo 1 em uma dose maior que 10 unidades de antígeno D e menor que 20 unidades de antígeno D.

2. Vacina de acordo com as reivindicações 1, caracterizada pelo fato de que o poliovírus inativados tipo 1 está presente de 26 a 49 %, 30 a 45 %, 33 a 40 % ou 35 a 37 % de dose unitária de antígeno D 40 padrão.

15 3. Vacina de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende poliovírus inativados tipo 3 em uma dose de 8 a 20 unidades de antígeno D, 9 a 19 unidades de antígeno D, 10 a 18 unidades de antígeno D, 11 a 17 unidades de antígeno D, 12 a 16 unidades de antígeno D ou 13 a 15 unidades de antígeno D; por exemplo em torno de ou exatamente 14 unidades de antígeno D.

20 4. Vacina de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende poliovírus inativados tipo 2 em uma quantidade de 2 a 4 unidades de antígeno D por 0,5 ml.

25 5. Vacina de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que um ou mais do toxóide da difteria, o toxóide do tétano; célula integral morta de *Bordetella pertussis*, os dois ou mais componentes de *pertussis* acelulares, os poliovírus inativados tipo 1, os poliovírus inativados tipo 2, os poliovírus inativados tipo 3, são absorvidos em hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio ou uma mistura de ambos.

6. Vacina de acordo com as reivindicações de 1 a 5,

caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende antígeno de superfície da Hepatite B, substancialmente isenta de tiomersal, opcionalmente absorvido em fosfato de alumínio.

7. Vacina de acordo com as reivindicações de 1 a 6, caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende um conjugado de uma proteína carregadora e o sacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo B (Hib), opcionalmente absorvido em fosfato de alumínio ou não absorvido em adjuvante.

8. Vacina de acordo com as reivindicações de 1 a 7, caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende um ou mais de: um ou mais conjugados de uma proteína carregadora e um sacarídeo capsular de uma bactéria selecionada do grupo Neisseria meningitidis tipo A, Neisseria meningitidis tipo C, Neisseria meningitidis tipo W e Neisseria meningitidis tipo Y, opcionalmente absorvido em hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio ou uma mistura de ambos ou não absorvido em adjuvante; uma vesícula de membrana externa de Neisseria meningitidis tipo B (MenB) ou LOS ou um sacarídeo capsular MenB conjugado ou derivado deste, opcionalmente absorvido em hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio ou uma mistura de ambos ou não absorvido em adjuvante; um sacarídeo Vi de Salmonella typhi conjugado a uma proteína carregadora, opcionalmente absorvido em hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio ou uma mistura de ambos ou não absorvido em adjuvante; ou um antígeno da Hepatite A, opcionalmente absorvido em hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio ou uma mistura de ambos.

9. Método para prevenir ou tratar infecção por poliovírus e opcionalmente infecção por Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae e Bordetella pertussis, caracterizado pelo fato de ser pela administração da vacina como definida nas reivindicações de 1 a 9 em um ser humano em necessidade destes.

10. Método para prevenir ou tratar infecção por poliovírus, Clostridium tetani, Corynebacterium difteria e Bordetella pertussis e opcionalmente uma ou mais infecções pela Hepatite B, Haemophilus influenzae b, Neisseria meningitidis tipo A, Neisseria meningitidis tipo C, 5 Neisseria meningitidis tipo W, Neisseria meningitidis tipo Y, Neisseria meningitidis tipo B, Salmonella typhi e Hepatite A, caracterizado pelo fato de ser pela administração da vacina como definida nas reivindicações de 1 a 8.

11. Uso de uma vacina como definida nas reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para a 10 prevenção de doença causada pelo poliovírus e opcionalmente Clostridium tetani, Corynebacterium difteria e Bordetella pertussis.

12. Uso de uma vacina como definida nas reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para a prevenção de doença causada pelo poliovírus, Clostridium tetani, 15 Corynebacterium difteria e Bordetella pertussis e opcionalmente um ou mais de Hepatite B, Haemophilus influenzae b, Neisseria meningitidis tipo A, Neisseria meningitidis tipo C, Neisseria meningitidis tipo W, Neisseria meningitidis tipo Y, Neisseria meningitidis tipo B, Salmonella typhi e Hepatite A.

20 13. Vacina, método ou uso de acordo com as reivindicações de 1 a 12, caracterizados pelo fato de que o IPV tipo 1, se presente, é da cepa Mahoney.

25 14. Vacina, método ou uso de acordo com as reivindicações de 1 a 13, caracterizados pelo fato de que o IPV tipo 2, se presente, é da cepa MEF-1.

15. Vacina, método ou uso de acordo com as reivindicações de 1 a 14, caracterizados pelo fato de que o IPV tipo 3, se presente, é da cepa Saukett.

Figura 1

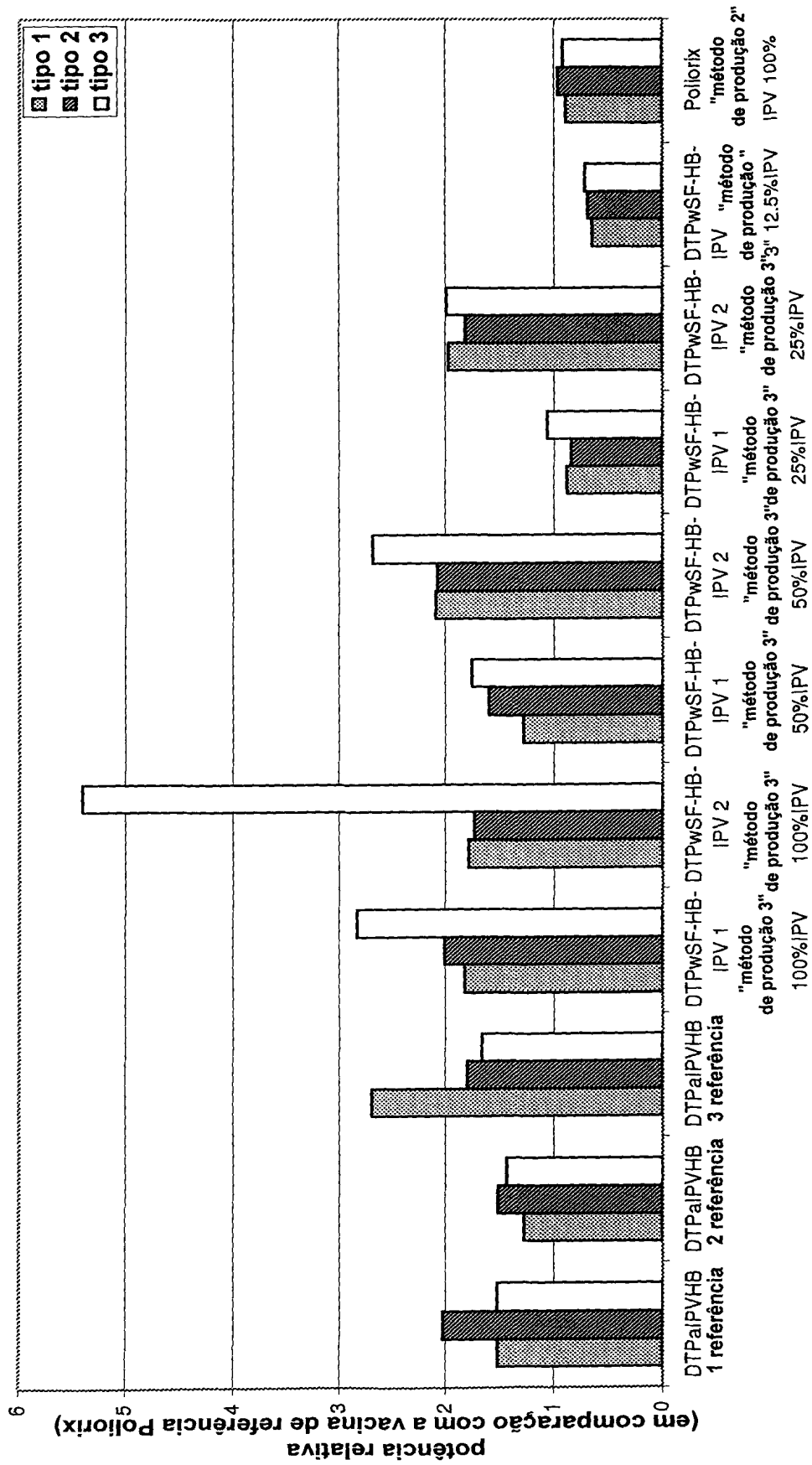


Figura 2

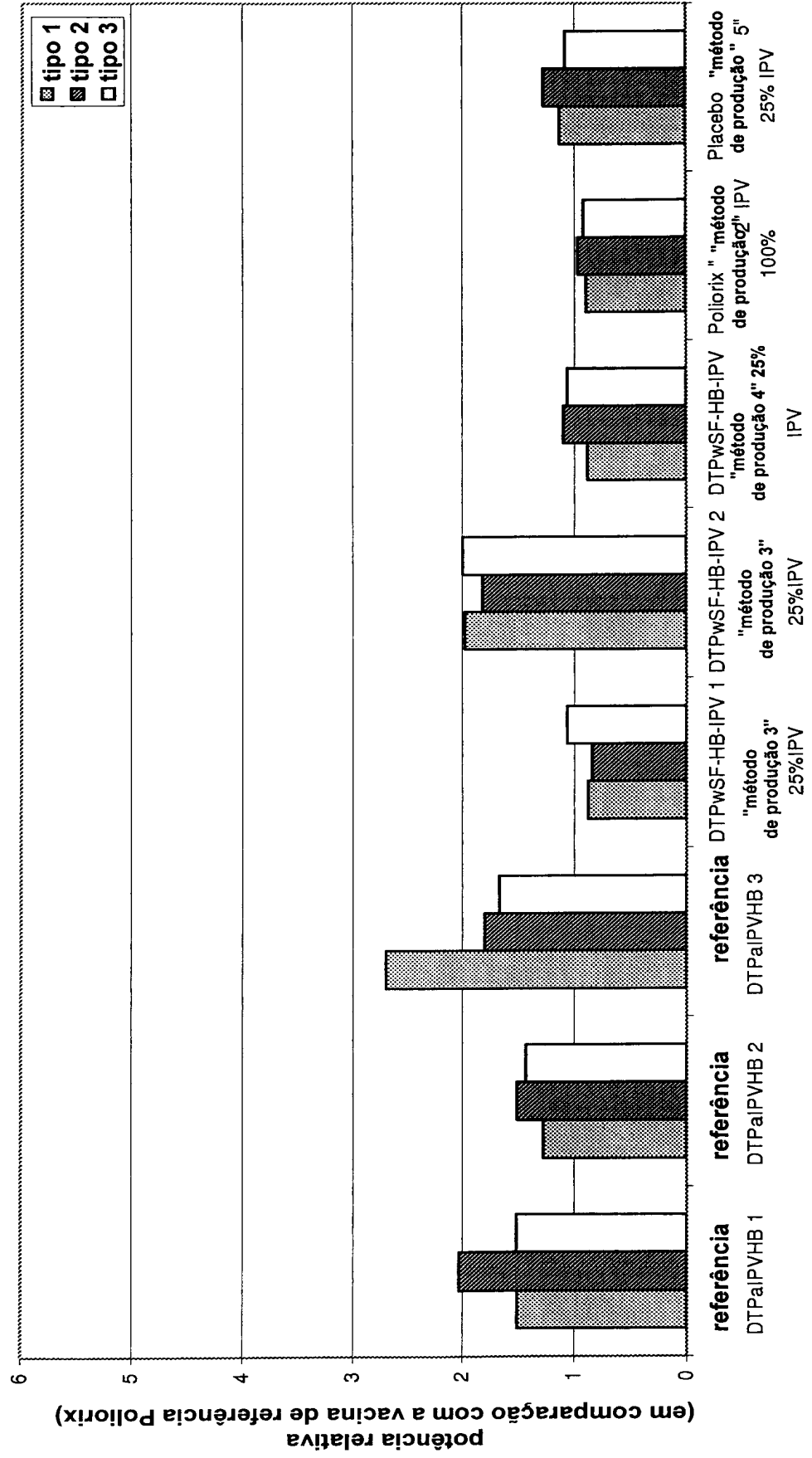
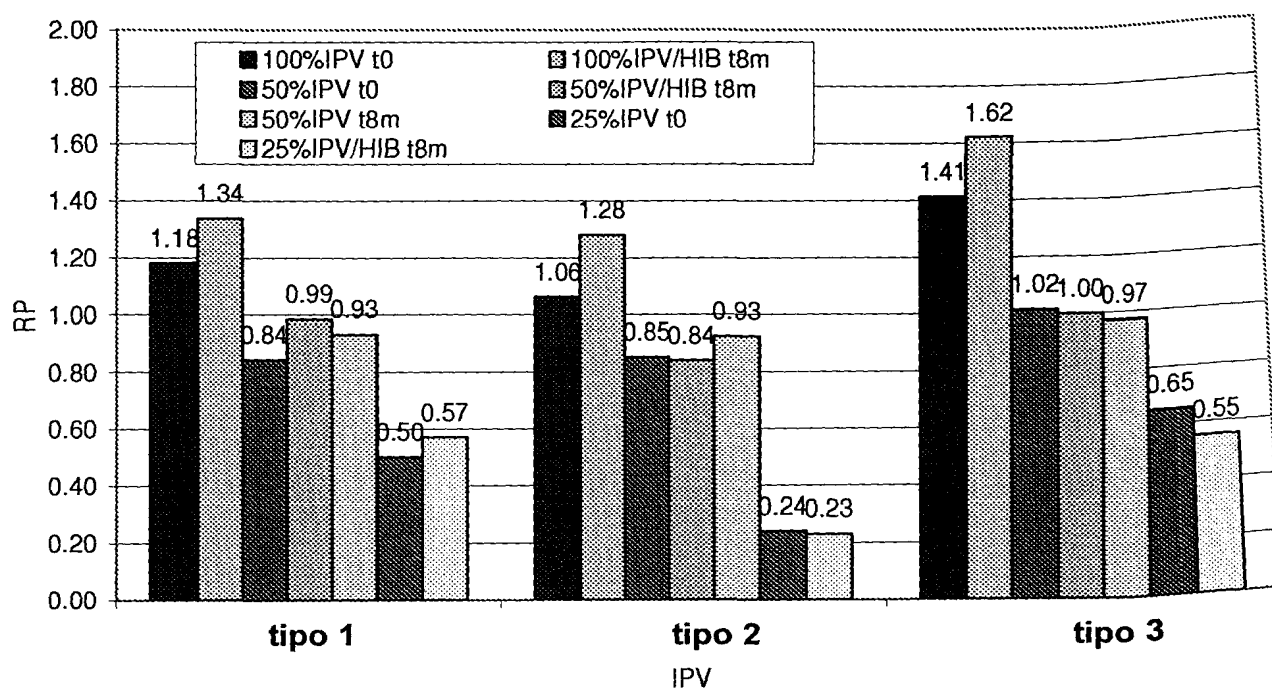
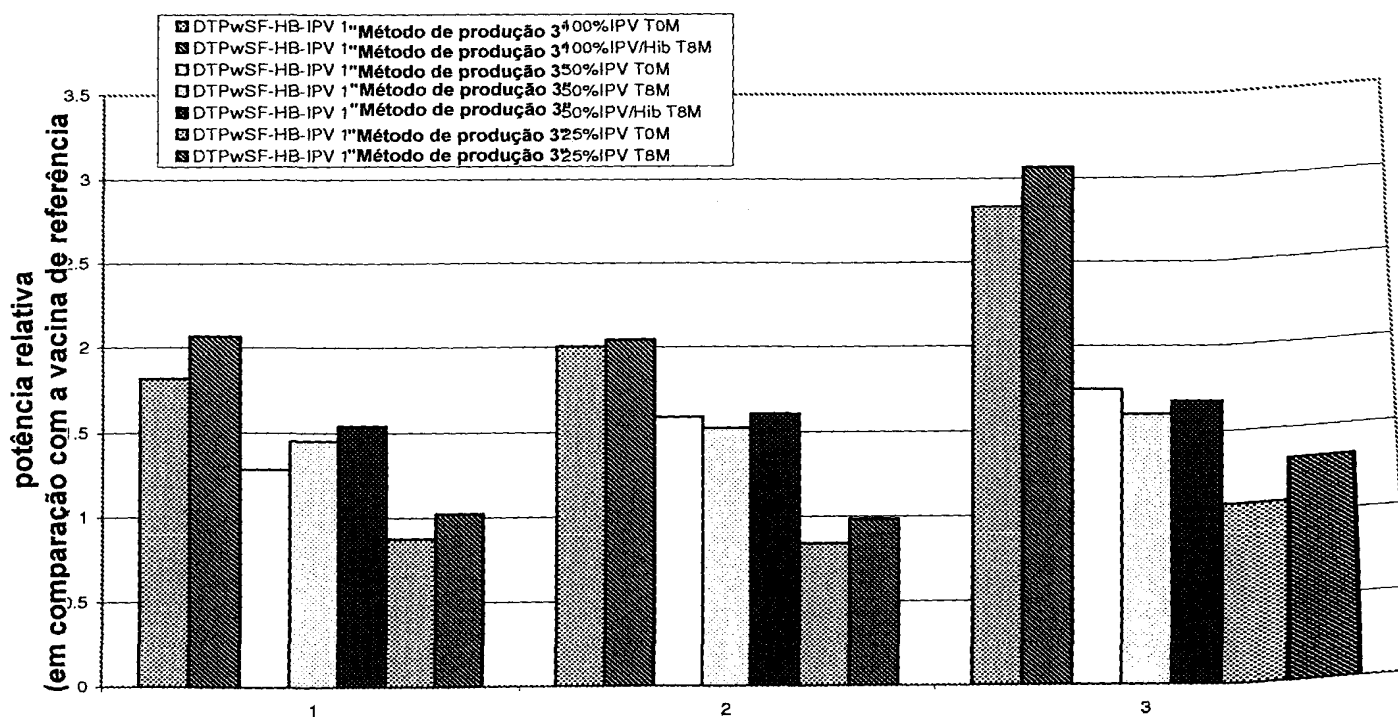


Figura 3

a)



b)

Figura 3

RESUMO

“VACINA, MÉTODO PARA PREVENIR OU TRATAR INFECÇÃO, E, USO DE UMA VACINA”

5 A dose padrão de vacinas da pólio contém 40 unidades de antígeno D de poliovírus inativados tipo 1 (Mahoney), 8 unidades de antígeno D de poliovírus inativados tipo 2 (MEF-1), e 32 Unidades de antígenos D de poliovírus inativados tipo 3 (Saukett). A presente invenção divulga que doses reduzidas de poliovírus inativados pode manter um nível adequado ou melhorado de proteção contra a pólio.