

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

(21) **PI 0713150-0 A2**

(22) Data de Depósito: 15/06/2007
(43) Data da Publicação: 27/03/2012
(RPI 2151)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/145

(54) **Título:** REGIME EM MULTIDOSES DE VACINAÇÃO DE INFLUENZA POUPADOR DE ADJUVANTE

(30) **Prioridade Unionista:** 15/06/2006 US 60/814.665

(73) **Titular(es):** Novartis Ag

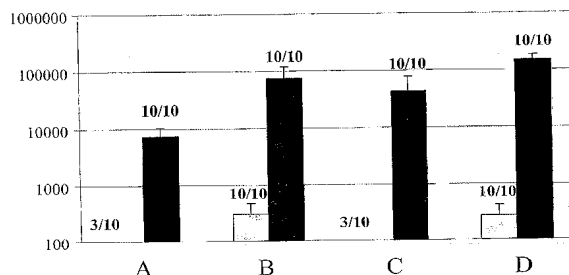
(72) **Inventor(es):** Giuseppe Del Giudice, Riccardo Manetti

(74) **Procurador(es):** Orlando de Souza

(86) **Pedido Internacional:** PCT IB2007002724 de 15/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/144772de
21/12/2007

(57) **Resumo:** REGIME EM MULTIDOSES DE VACINAÇÃO DE INFLUENZA POUPADOR DE ADJUVANTE. Uma vacina de influenza é administrada por um regime de multidoses, em que (i) uma primeira dose é administrada com um adjuvante e (ii) uma dose posterior é administrada sem um adjuvante ou com um adjuvante diferente. Portanto, a invenção fornece o benefício de um regime de duas doses sem também duplicar a necessidade de suprimento por um dado adjuvante.



REGIME EM MULTIDOSES DE VACINAÇÃO DE INFLUENZA POUPADOR DE ADJUVANTE

Todos os documentos citados nesta especificação são aqui incorporados em sua totalidade por referência.

5 Campo técnico

Esta invenção está no campo de vacinas para proteção contra infecção por vírus influenza.

Técnica de fundamento

Pacientes que recebem vacinas para influenza recebem
10 atualmente uma dose a cada ano, exceto quando uma criança de 8 anos ou menos recebe a vacina pela primeira vez, pois, nesse caso, ela recebe duas doses separadas por pelo menos quatro semanas.

Acredita-se que (por exemplo, veja a ref. 1) um regime
15 de duas doses também será necessário em uma situação pandêmica, em que a população humana é imunologicamente não sensibilizada a uma nova cepa de vírus influenza.

A necessidade por duas doses significa que, com um suprimento fixo de antígeno, o número de doses que pode ser
20 feito é metade do número que pode ser feito com um regime de uma dose. Portanto, foi proposto o uso de uma menor quantidade de antígeno por dose, e o uso de um adjuvante para compensar essa redução.

Se um regime de uma dose de uma vacina com adjuvante
25 não desperta uma resposta imune suficiente, no entanto, então um regime de duas doses será necessário de qualquer modo, com a desvantagem adicional de que o suprimento de quantidades adequadas de adjuvante também será um problema. Em uma situação em que centenas de milhões de doses de
30 vacina com adjuvante estão sendo preparadas, então esse

problema será muito importante, e será particularmente importante para adjuvantes sintéticos.

É um objetivo da invenção reduzir ou impedir essa desvantagem.

5 Revelação da invenção

De acordo com a invenção, uma vacina de influenza é administrada por um regime de multidoses, em que (i) uma primeira dose é administrada com um adjuvante e (ii) uma dose posterior é administrada com um adjuvante ou sem um
10 diferente adjuvante. Assim, a invenção fornece os benefícios de um regime de duas doses sem também duplicar a necessidade por um dado adjuvante. A primeira dose e a última dose devem ser preferivelmente dadas pela mesma via de administração (por exemplo, ambas por injeção
15 intramuscular), enquanto o estudo na referência 2 usou um reforço mucoso sem adjuvante como uma terceira dose em um regime de três doses para determinar se a via de sensibilização parenteral em camundongos (dorso vs. pescoço) afetou a imunogenicidade de uma vacina com
20 adjuvante.

Portanto, a invenção fornece um método para imunização de um paciente contra infecção por vírus influenza, que compreende as etapas de (i) administração de uma dose de vacina de vírus influenza em combinação com um primeiro
25 adjuvante; e (ii) administração de uma dose adicional de vacina de vírus influenza sem aquele adjuvante. A dose adicional pode não incluir adjuvante ou pode incluir um segundo adjuvante que é diferente do primeiro adjuvante.

A invenção também fornece um kit que compreende: (i)
30 uma primeira vacina de vírus influenza em combinação com um

primeiro adjuvante; e (ii) uma segunda vacina de vírus influenza sem aquele adjuvante. A invenção também fornece o uso de (i) uma primeira vacina de vírus influenza em combinação com um primeiro adjuvante; e (ii) uma segunda
5 vacina de vírus influenza sem aquele adjuvante, na manufatura de uma vacina de influenza de multidoses. A segunda vacina pode não incluir adjuvante ou pode incluir um segundo adjuvante que é diferente do primeiro adjuvante.

A invenção também fornece um método para realização da
10 imunização de um paciente contra infecção por vírus influenza, em que o paciente recebeu previamente uma dose de vacina de vírus influenza em combinação com um primeiro adjuvante, e em que o método compreende a etapa de administração àquele paciente de uma dose adicional de
15 vacina de vírus influenza sem aquele adjuvante. A dose adicional pode não incluir adjuvante ou pode incluir um segundo adjuvante que é diferente do primeiro adjuvante.

A invenção também fornece o uso de uma vacina de vírus influenza sem adjuvante na manufatura de um medicamento
20 para a imunização de um paciente contra infecção por vírus influenza, em que aquele paciente recebeu previamente uma vacina de vírus influenza com adjuvante. A invenção também fornece o uso de uma segunda vacina de vírus influenza com adjuvante na manufatura de um medicamento para imunização
25 de um paciente contra infecção por vírus influenza, em que aquele paciente recebeu previamente uma primeira vacina de vírus influenza com adjuvante, em que os adjuvantes na primeira e na segunda vacinas de vírus influenza não são o mesmo.

30 Esses métodos, kits e usos são particularmente

vantajosos se as doses de hemaglutinina nas duas vacinações forem menores que o padrão de 15 µg por cepa por dose, uma vez que a invenção então permite a atenuação de requisitos para antígeno e adjuvante.

5 O antígeno de vírus influenza

Vacinas usadas com a invenção incluem um antígeno de vírus influenza. O antígeno será tipicamente preparado a partir de vírion de influenza, mas, como uma alternativa, antígenos como hemaglutinina e neuraminidase podem ser expressos em um hospedeiro recombinante (por exemplo, em uma linhagem de células de inseto que usa um vetor de um baculovírus) e usados em forma purificada [3,4,5]. Em geral, no entanto, os antígenos serão de vírions.

O antígeno pode tomar a forma de um vírus vivo ou, mais preferivelmente, um vírus inativado. Meios químicos para inativação de um vírus incluem tratamento com uma quantidade eficaz de um ou mais dos seguintes agentes: detergentes, formaldeído, formalina, β-propiolactona ou luz UV. Meios químicos adicionais para inativação incluem tratamento com azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60) ou uma combinação de qualquer um destes. Outros métodos de inativação viral são conhecidos na técnica, como, por exemplo, etilamina binária, acetil etilenoimina ou irradiação gama. O produto INFLEXAL™ é uma vacina de vírion inteiro inativado.

Quando um vírus inativado é usado, a vacina pode compreender vírion inteiro, vírion dividido, ou antígenos de superfície purificados (incluindo hemaglutinina e, comumente, também incluindo neuraminidase).

Tipicamente, cada dose de vacina em um regime de

multidose usará a mesma forma de antígeno, por exemplo, ela não usará uma vacina de vírion dividido para uma primeira dose e uma vacina de vírion inteiro para uma segunda dose.

Vírions podem ser coletados de fluidos que contêm
5 vírus por vários métodos. Por exemplo, um processo de purificação pode envolver centrifugação zonal com o uso de uma solução de gradiente linear de sacarose que inclui detergente para romper os vírions. Os antígenos podem ser então purificados, depois de diluição adicional, por
10 diafiltração.

Vírions divididos são obtidos por tratamento dos vírions com detergentes (por exemplo, éter etílico, polissorbato 80, desoxicolato, tri-N-butil fosfato, Triton X-100, Triton N101, brometo de cetiltrimetilamônio,
15 Tergitol NP9 etc.) para produzir preparações de subvírions, incluindo o processo de divisão com "Tween-éter". Métodos de divisão de vírus influenza são bem conhecidos na técnica; por exemplo, veja as refs. 6-11 etc. A divisão do vírus é tipicamente realizada por rompimento ou
20 fragmentação de vírus inteiro, seja infeccioso ou não infeccioso com uma concentração de rompimento de um agente de divisão. O rompimento resulta em uma solubilização total ou parcial das proteínas virais, alterando a integridade do vírus. Agentes de divisão preferidos são tensoativos não
25 iônicos e iônicos (por exemplo, catiônicos), por exemplo, alquilglicosídeos, alquiltioglicosídeos, açúcares de acil, sulfobetáinas, betáinas, polioxietilenoalquiléteres, N,N-dialquil-Glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-
polietoxietanóis, compostos de amônio quaternário,
30 sarcosil, CTABs (brometos de cetil trimetil amônio), tri-N-

butil fosfato, Cetavlon, sais de miristiltrimetilamônio, lipofectina, lipofectamina e DOT-MA, os octil- ou nonilfenoxi polioxietanóis (por exemplo, os tensoativos de Triton, como Triton X-100 ou Triton N101), ésteres de polioxietileno sorbitano (os tensoativos de Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno etc. Um procedimento de divisão útil usa os efeitos consecutivos de desoxicolato de sódio e formaldeído, e a divisão pode ocorrer durante a purificação inicial do vírion (por exemplo, em uma solução de gradiente de densidade de sacarose). Assim, um processo de divisão envolve a clarificação do material que contém o vírion (para remover material não relacionado a vírion), concentração dos vírions coletados (por exemplo, com a utilização de um método de adsorção, como adsorção de CaHPO_4), separação dos vírions totais do material não relacionado a vírion, divisão dos vírions com o uso de um agente de divisão em uma etapa de centrifugação de gradiente de densidade (por exemplo, com o uso de um gradiente de sacarose que contém um agente de divisão como desoxicolato de sódio), e então filtração (por exemplo, ultrafiltração) para remover materiais indesejados. Os vírions divididos podem ser ressuspensos, de modo útil, em solução de cloreto de sódio tamponada por fosfato de sódio. Os produtos BEGRIVACTM, FLUARIXTM, FLUZONETM e FLUSHIELDTM são vacinas divididas.

Vacinas de antígeno de superfície purificado compreendem a hemaglutinina dos antígenos de superfície de influenza e, tipicamente, também neuraminidase. Processos para a preparação dessas proteínas em forma purificada são bem conhecidos na técnica. Os produtos FLUVIRINTM,

AGRIPPALTM e INFLUVACTM são vacinas de subunidade.

Antígenos de influenza também podem ser apresentados na forma de virossomos [12] (partículas lipossômicas virais livres de ácido nucléico), como nos produtos INFLEXAL VTM e
5 INVAVACTM, mas é preferível não usar virossomos com a presente invenção. Portanto, em algumas modalidades, o antígeno de influenza não está na forma de um virossomo.

O vírus influenza pode ser atenuado. O vírus influenza pode ser sensível à temperatura. O vírus influenza pode ser
10 adaptado ao frio. Essas três características são particularmente úteis quando do uso de vírus vivo como um antígeno.

As cepas de vírus influenza para uso em vacinas se modificam de estação em estação. No atual período inter-
15 pandêmico, as vacinas tipicamente incluem duas cepas de influenza A (H1N1 e H3N2) e uma cepa de influenza B, e vacinas trivalentes são típicas. A invenção pode ser usada com essas vacinas, mas é particularmente útil para vírus de cepas pandêmicas (ou seja, cepas para as quais o receptor
20 da vacina e a população humana geral são imunologicamente virgens), como cepas de subtipo H2, H5, H7 ou H9 (em particular de vírus influenza A), e vacinas de influenza para cepas pandêmicas podem ser monovalentes ou podem ser baseadas em uma vacina trivalente normal suplementada por
25 uma cepa pandêmica. Dependendo da estação e da natureza do antígeno incluído em uma vacina, no entanto, a invenção pode proteger contra um ou mais subtipos de hemaglutinina de vírus influenza A H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 ou H16. A invenção pode
30 proteger contra um ou mais dos subtipos NA de vírus

influenza A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 ou N9.

Outras cepas que podem ser incluídas de forma proveitosa nas composições são cepas que são resistentes à terapia antiviral (por exemplo, resistentes a oseltamivir
5 [13] e/ou zanamivir), incluindo cepas pandêmicas resistentes [14].

A invenção é particularmente útil para imunização contra cepas pandêmicas. As características de uma cepa de influenza que a tornam potencialmente causadoras de um
10 surto pandêmico são: (a) ela contém uma nova hemaglutinina comparada a hemaglutininas em cepas humanas atualmente em circulação, ou seja, uma que não tenha sido evidente na população humana por uma década (por exemplo, H2), ou que não foi observada previamente na população humana (por
15 exemplo, H5, H6 ou H9, que tem sido encontrada geralmente em populações de aves), de modo que a população humana será imunologicamente virgem à hemaglutinina da cepa; (b) ela é capaz de ser transmitida horizontalmente na população humana; e (c) ela é patogênica para humanos. Um vírus com
20 tipo H5 de hemaglutinina é preferido para imunização contra influenza pandêmico, como uma cepa H5N1. Outras cepas possíveis incluem H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 e H7N7, e quaisquer outras cepas emergentes potencialmente pandêmicas. No subtipo H5, um vírus pode estar na HA clade
25 1, HA clade 1', HA clade 2 ou HA clade 3 [15], com as clades 1 e 3 sendo particularmente relevantes.

Tipicamente, cada dose de vacina em um regime de multidoses partilhará pelo menos um subtipo comum de hemaglutinina, por exemplo, a invenção não usará uma vacina
30 monovalente H5N1 para uma primeira dose, mas uma vacina

monovalente H9N2 para uma segunda dose.

Composições da invenção podem incluir antígenos de uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou mais) cepas do vírus influenza, incluindo vírus influenza A e/ou vírus influenza B. Quando a vacina inclui mais de uma cepa de influenza, as diferentes cepas crescem tipicamente separadamente e são misturadas depois que os vírus foram coletados e os antígenos preparados. Portanto, um processo da invenção pode incluir a etapa de mistura de antígenos de mais uma cepa de vírus influenza. Para situações pandêmicas, no entanto, uma vacina monovalente pode ser preferida.

O vírus influenza pode ser uma cepa reclassificada, pode ter sido obtida por técnicas de genética reversa. As técnicas de genética reversa [por exemplo, 16-20] permitem que sejam preparados vírus influenza com segmentos de genoma desejados *in vitro* com a utilização de plasmídeos. Tipicamente, ela envolve a expressão de (a) moléculas de DNA que codificam moléculas de RNA viral desejadas, por exemplo, de promotores polII, e (b) moléculas de DNA que codificam proteínas virais, por exemplo, de promotores polIII, de modo que a expressão de ambos os tipos de DNA em uma célula leva à montagem de um vírion infeccioso intacto completo. O DNA preferivelmente fornece todo o RNA viral e proteínas, mas também é possível usar um vírus *helper* para fornecer algum do RNA e proteínas. Métodos com base em plasmídeo que usam plasmídeos separados para produção de cada RNA viral são preferidos [21-23], e esses métodos também envolverão o uso de plasmídeos para expressar todas ou algumas (por exemplo, apenas as proteínas PB1, PB2, PA e NP) das proteínas virais, com até 12 plasmídeos sendo

usados em alguns métodos.

Para reduzir o número de plasmídeos necessários, uma recente abordagem [24] combina uma pluralidade de cassetes de transcrição de RNA polimerase I (para síntese de RNA viral) no mesmo plasmídeo (por exemplo, seqüências que codificam 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou todos os 8 segmentos de vRNA de influenza A), e uma pluralidade de regiões codificadoras de proteína com promotores de RNA polimerase II em um outro plasmídeo (por exemplo, seqüências que codificam 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou todos os 8 transcritos de mRNA de influenza A). Aspectos preferidos do método da referência 24 envolvem: (a) regiões codificadoras de mRNA de PB1, PB2 e PA em um único plasmídeo; e (b) todos os 8 segmentos que codificam vRNA em um plasmídeo único. A inclusão dos segmentos NA e HA em um plasmídeo e os seis outros segmentos em um outro plasmídeo também podem facilitar questões.

Como uma alternativa ao uso de promotores polI para codificar os segmentos de RNA viral, é possível usar promotores de polimerase de bacteriófago [25]. Por exemplo, promotores para as SP6, T3 ou T7 polimerases podem ser convenientemente usados. Devido à especificidade de espécie de promotores polI, promotores de polimerase de bacteriófago podem ser mais convenientes para vários tipos de células (por exemplo, MDCK), embora uma célula também deva ser transfectada com um plasmídeo que codifica a enzima polimerase exógena.

Em outras técnicas, é possível usar promotores duplos polI e polII para codificar simultaneamente para os RNAs virais e para mRNAs expressíveis para um único modelo

[26,27].

Portanto, o vírus, particularmente um vírus influenza A, pode incluir um ou mais segmentos de RNA de um vírus A/PR/8/34 (tipicamente, 6 segmentos de A/PR/8/34, com os
5 segmentos HA e N sendo uma cepa de vacina, ou seja um, 6:2 de reclassificação), particularmente quando os vírus crescem em ovos. Ele também pode incluir um ou mais segmentos de RNA de um vírus A/WSN/33, ou de qualquer outra cepa viral útil para geração de vírus reclassificado para
10 preparação de vacina. Tipicamente, a invenção protege contra uma cepa que é capaz de transmissão humano-a-humano, e assim o genoma da cepa comumente incluirá pelo menos um segmento de RNA que se originou em um vírus influenza de mamífero (por exemplo, em um humano). Ele pode incluir
15 segmento NS que se originou em um vírus influenza de ave.

Os vírus usados como a fonte dos antígenos podem crescer em ovos ou em cultura de células. O atual método padrão para crescimento de vírus influenza usa ovos de galinha embrionados específicos livres de patógenos (SPF),
20 com o vírus sendo purificado do conteúdo do ovo (fluido alantóico). Mais recentemente, no entanto, os vírus cresceram em cultura de células de animal e, por razões de velocidade e alergias do paciente, esse método de crescimento é preferível. Se o crescimento viral com base
25 em ovo for usado, então um ou mais aminoácidos podem ser introduzidos no fluido alantóide do ovo junto com o vírus [11].

Quando cultura de células é usada, o substrato do crescimento viral será tipicamente uma linhagem de células
30 de origem em mamífero. Células de mamífero adequadas de

origem incluem, sem limitação, células de hamster, gado, primata (incluindo humanos e macacos) e cães. Vários tipos de células podem ser usados, como células de rim, fibroblastos, células retinianas, células pulmonares etc.

5 Exemplos de células de hamster adequadas são as linhagens de células que têm os nomes BHK21 ou HKCC. Células de macaco adequadas são, por exemplo, células de macaco verde africano, como células renais, como na linhagem de células Vero. Células adequadas de cães são, por exemplo, células
10 renais, como na linhagem de células MDCK. Portanto, linhagens de células adequadas incluem, sem limitação: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. Linhagens de células de mamíferos preferidas para o crescimento de vírus influenza incluem: células MDCK [28-
15 31], derivadas de rim canino Madin Darby; células Vero [32-34], derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aetiops*); ou células PER.C6 [35], derivadas de retinoblastos embriônicos humanos. Essas linhagens de células são amplamente disponíveis, por exemplo, da coleção
20 da "American Type Cell Culture" (ATCC) [36], do "Coriell Cell Repositories" [37], ou da "European Collection of Cell Cultures" (ECACC). Por exemplo, a ATCC supre várias células Vero diferentes sob números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 e CRL-1587, e ela supre células MDCK sob números
25 de catálogo CCL-34. PER.C6 é disponível a partir de ECACC sob número de depósito 96022940. Como uma alternativa menos preferida para linhagens de células de mamífero, os vírus podem crescer em linhagens de células de ave [por exemplo, refs. 38-40], incluindo linhagens de células derivadas de
30 patos (por exemplo, de retina) ou galinhas. Exemplos de

linhagens de células de aves incluem células tronco embriônicas de ave [38,41] e células da retina de pato [39]. As células tronco embriônicas de ave adequadas incluem a linhagem de células EBx derivada de células tronco embriônicas de galinha, EB45, EB14, e EB14-074 [42].
5 Fibroblastos de embrião de galinha (CEF) também podem ser usados.

As linhagens de células mais preferidas para crescimento de vírus influenza são linhagens de células MDCK. A linhagem de células MDCK original é disponível pela
10 ATCC como CCL-34, mas derivados dessa linhagem de células também podem ser usados. Por exemplo, a referência 28 revela uma linhagem de células MDCK que foi adaptada para crescer em cultura em suspensão ('MDCK 33016', depositada
15 como DSM ACC 2219). De modo similar, a referência 43 revela uma linhagem de células derivadas de MDCK que cresce em suspensão em cultura livre de soro ('B-702', depositada como FERM BP-7449). A referência 44 revela células MDCK não tumorigênicas, incluindo 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) e
20 'MDCK-SF103' (PTA-6503). A referência 45 revela linhagens de células MDCK com alta suscetibilidade a infecção, incluindo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Qualquer uma dessas linhagens de células MDCK pode ser usada.

25 Quando o vírus tiver crescido em uma linhagem de células de mamífero, então a composição será livre de proteína do ovo (por exemplo, ovalbumina e ovomucoide) e do DNA de galinha, assim reduzindo a alergenicidade.

Quando o vírus tiver crescido em uma linhagem de
30 células, então a cultura para crescimento, e também o

inóculo viral usado para iniciar a cultura, serão preferivelmente livres de (ou seja, terão sido testados para, e terão recebido um resultado negativo para contaminação por) vírus herpes simples, vírus sincicial respiratório, vírus parainfluenza 3, coronavírus SARS, adenovírus, rinovírus, reovírus, poliomavírus, birnavírus, circovírus, e/ou parvovírus [46]. A ausência de vírus herpes simples é particularmente preferida.

Para crescimento em uma linhagem de células, como em células MDCK, os vírus podem crescer em células em suspensão [47-49] ou em cultura aderente. Uma linhagem de células MDCK adequada para cultura em suspensão é MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como uma alternativa, cultura de microtransportador pode ser usada.

Linhagens de células que sustentam a replicação de vírus influenza crescem preferivelmente em meio de cultura livre de soro e/ou meio livre de proteína. Um meio é referido como um meio livre de soro no contexto da presente invenção em que não haja aditivos do soro de origem humana ou animal. Livre de proteína é entendido como culturas em que a multiplicação das células ocorre com exclusão de proteínas, fatores de crescimento, outros aditivos de proteína e proteínas não séricas, mas pode incluir opcionalmente proteínas como tripsina ou outras proteases que podem ser necessárias para o crescimento viral. As células que crescem em tais culturas contêm, elas mesmas, naturalmente, proteínas.

Linhagens de células que sustentam a replicação de vírus influenza crescem preferivelmente abaixo de 37°C [50] durante a replicação viral, por exemplo, 30-36°C.

O método para propagação do vírus em células cultivadas geralmente inclui as etapas de inoculação das células cultivadas com a cepa a ser cultivada, cultivo das células infectadas por um período de tempo desejado para a propagação do vírus, como, por exemplo, determinado pelo título viral ou expressão de antígeno (por exemplo, entre 24 e 168 horas após a inoculação) e coleta do vírus propagado. As células cultivadas são inoculadas com um vírus (medido por PFU ou TCID₅₀) a uma proporção de célula de 1:500 a 1:1, preferivelmente 1:100 a 1:5, mais preferivelmente 1:50 a 1:10. O vírus é adicionado a uma suspensão das células ou é aplicado a uma monocamada das células, e o vírus é absorvido nas células por pelo menos 60 minutos, mas comumente menos que 300 minutos, preferivelmente entre 90 e 240 minutos a 25°C a 40°C, preferivelmente 28°C a 37°C. A cultura de células infectada (por exemplo, monocamadas) pode ser removida por congelamento-descongelamento ou por ação enzimática para aumentar o conteúdo viral dos sobrenadantes da cultura coletada. Os fluidos coletados são então inativados ou estocados congelados. Células cultivadas podem ser infectadas em uma multiplicidade de infecções ("m.o.i.") de cerca de 0,0001 a 10, preferivelmente 0,002 a 5, mais preferivelmente 0,001 a 2. Ainda mais preferivelmente, as células são infectadas em uma m.o.i. de cerca de 0,01. As células infectadas podem ser coletadas 30 a 60 horas após a infecção. Preferivelmente, as células são coletadas 34 a 48 horas após a infecção. Ainda mais preferivelmente, as células são coletadas 38 a 40 horas após a infecção. Proteases (tipicamente tripsina) são geralmente adicionadas

durante a cultura de células para permitir a liberação viral, e as proteases podem ser adicionadas em qualquer estágio durante a cultura.

Hemaglutinina (HA) é o principal imunógeno em vacinas
5 inativadas de influenza, e as doses da vacina são padronizadas por referência aos níveis de HA, tipicamente como medido por um único ensaio de imunodifusão radial (SRID). As vacinas atuais contêm tipicamente cerca de 15 µg de HA por cepa, embora doses menores também sejam usadas,
10 por exemplo, para crianças, ou em situações pandêmicas. Doses fracionadas, como 1/2 (ou seja, 7,5 µg HA por cepa), 1/4 e 1/8 têm sido usadas [51,52], assim como doses maiores (por exemplo, 3x ou 9x doses [53,54]). Portanto, vacinas podem incluir entre 0,1 e 150 µg de HA por cepa de
15 influenza, preferivelmente entre 0,1 e 50 µg, por exemplo, 0,1-20 mg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg etc. Doses particulares incluem, por exemplo, cerca de 45, cerca de 30, cerca de 15, cerca de 10, cerca de 7,5, cerca de 5, cerca de 3,8, cerca de 1,9, cerca de 1,5 etc. µg por cepa.
20 Essas doses menores são mais úteis quando um adjuvante está presente em uma vacina, como com a invenção.

Para vacinas vivas, a dosagem é medida por média de dose infecciosa de cultura de tecido (TCID₅₀) em vez de conteúdo de HA, e uma TCID₅₀ entre 10⁶ e 10⁸
25 (preferivelmente entre 10^{6,5}-10^{7,5}) por cepa é típica.

HA usada com a invenção pode ser uma HA natural como encontrado em um vírus, ou pode ter sido modificada. Por exemplo, é conhecida a modificação de HA para remover determinantes (por exemplo, regiões hiper-básicas ao redor
30 do sítio de clivagem entre HA1 e HA2) que tornam um vírus

altamente patogênico em espécies de aves, uma vez que esses determinantes podem evitar que um vírus cresça em ovos.

As composições da invenção podem incluir detergente, por exemplo, um tensoativo de éster de polioxietileno sorbitano (conhecidos como 'Tweens'), um octoxinol (como octoxinol-9 (Triton X-100) ou t-octilfenoxipolietoxi etanol), um brometo de cetil trimetil amônio ('CTAB'), ou desoxicolato de sódio, particularmente para uma vacina dividida ou de antígeno de superfície. O detergente pode estar presente apenas em quantidades de traço. Portanto, a vacina pode incluir menos que 1 mg/ml de cada um de octoxinol-10, α -tocoferil hidrogênio succinato e polissorbato 80. Outros componentes residuais em quantidades de traço podem ser antibióticos (por exemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

Uma vacina inativada, mas não de célula inteira (por exemplo, uma vacina de vírus dividido ou uma vacina de antígeno de superfície purificada), pode incluir proteína de matriz, para se beneficiar dos epitopos de célula T adicionais que estão localizados nesse antígeno. Assim, uma vacina não de célula inteira (particularmente uma vacina dividida) que inclui hemaglutinina e neuraminidase pode incluir adicionalmente proteína de matriz M1 e/ou M2, ou fragmentos desta. Quando uma proteína de matriz é presente, a inclusão de níveis detectáveis de proteína de matriz M1 é preferida. Nucleoproteína também pode estar presente.

DNA de célula hospedeira

Quando o vírus cresce em uma linhagem de células, então é prática padrão minimizar a quantidade de DNA residual de linhagem de células na vacina final, para

minimizar qualquer atividade oncogênica do DNA. Portanto, quando o vírus cresce em uma linhagem de células, a composição preferivelmente contém menos que 10 ng (preferivelmente menos que 1 ng, e mais preferivelmente 5 menos que 100 pg) de DNA residual de célula hospedeira por dose, embora quantidades de traço de DNA de célula hospedeira possam estar presentes. É preferível que o comprimento médio de qualquer DNA residual de célula hospedeira seja menor que 500 bp, por exemplo, menor que 10 400 bp, menor que 300 bp, menor que 200 bp, menor que 100 bp etc. Em geral, o DNA de célula hospedeira que é desejável excluir das composições da invenção é DNA que é maior que 100 bp.

A medição do DNA residual de célula hospedeira é agora 15 um requisito regulador rotineiro para os biólogos e está dentro das capacidades normais do profissional habilitado. O ensaio usado para medir DNA será tipicamente um ensaio validado [55,56]. As características de performance de um ensaio validado podem ser descritas em termos matemáticos e 20 quantificáveis, e suas fontes possíveis de erro serão identificadas. O ensaio terá sido geralmente testado para características como precisão e especificidade. Uma vez que um ensaio tenha sido calibrado (por exemplo, contra quantidade padronizadas conhecidas de DNA de célula 25 hospedeira) e testado, então as medições quantitativas de DNA podem ser realizadas rotineiramente. Três técnicas fundamentais para quantificação de DNA podem ser usadas: métodos de hibridização, como *Southern blots* ou *slot blots* [57]; métodos de imunoensaio, como o Sistema Threshold™ 30 [58]; e PCR quantitativa [59]. Esses métodos são todos

familiares para o profissional habilitado, embora as características precisas de cada método possam depender da célula hospedeira em questão, por exemplo, a escolha de marcadores para hibridização, a escolha de iniciadores e/ou marcadores para amplificação etc. O sistema Threshold™ de "Molecular Devices" é um ensaio quantitativo para níveis de picograma de DNA total, e tem sido usado para monitorar os níveis de DNA contaminante em biofármacos [58]. Um ensaio típico envolve a formação não específica para sequência de um complexo de reação entre uma proteína de ligação de ssDNA biotinilado, um anticorpo anti-ssDNA conjugado a urease e DNA. Todos os componentes do ensaio são incluídos no "Total DNA Assay Kit" completo disponível pelo fabricante. Vários fabricantes comerciais oferecem ensaio de PCR quantitativa para detecção de DNA residual de célula hospedeira, por exemplo, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies etc. Uma comparação de um ensaio de hibridização quimioluminescente e o sistema Threshold™ de DNA total para medição da contaminação de DNA de célula hospedeira de uma vacina viral humana pode ser encontrada na referência 60.

DNA contaminante pode ser removido durante a preparação de vacina com o uso de procedimento padrão de purificação, por exemplo, cromatografia etc. A remoção de DNA residual de célula hospedeira pode ser melhorada por tratamento com nuclease, por exemplo, pelo uso de uma DNase. Um método conveniente para redução da contaminação do DNA de célula hospedeira é revelado nas referências 61 & 62, que envolvem um tratamento de duas etapas, primeiramente com a utilização de uma DNase (por exemplo,

Benzonase), que pode ser usada durante o crescimento viral, e então um detergente catiônico (por exemplo, CTAB), que pode ser usado durante o rompimento do vírion. Tratamento com um agente de alquilação, como β -propiolactone, também
5 pode ser usado para remover DNA de célula hospedeira, e vantajosamente também pode ser usado para inativar vírions [63].

Vacinas que contêm <10ng (por exemplo, <1ng, <100pg) de DNA de célula hospedeira por 15 μ g de hemaglutinina são
10 preferidas, assim como são vacinas que contêm <10ng (por exemplo, <1ng, <100pg) de DNA de célula hospedeira por 0,25 ml de volume. Vacinas que contêm <10ng (por exemplo, <1ng, <100pg) de DNA de célula hospedeira por 50 μ g de hemaglutinina são mais preferidas, assim como são vacinas
15 que contêm <10ng (por exemplo, <1ng, <100pg) de DNA de célula hospedeira por 0,5 ml de volume.

Os adjuvantes

A invenção envolve a administração inicial de uma vacina com adjuvante. Vacinas adicionais podem ser sem
20 adjuvante, ou elas podem ter adjuvante, mas com um adjuvante diferente do da administração inicial. Os adjuvantes podem funcionar para melhorar as respostas imunes (humoral e/ou celular) produzidas em um paciente que recebe a composição.

25 Adjuvantes adequados para uso com a primeira vacina, e para uso opcional com doses de vacina adicional, incluem, mas não são limitados a:

- uma composição que contém mineral, que inclui sais de cálcio e sais de alumínio (ou misturas destes). Sais de
30 cálcio incluem fosfato de cálcio (por exemplo, as

partículas "CAP" reveladas na ref. 64). Sais de alumínio incluem hidróxidos, fosfatos, sulfates etc., com os sais tomando qualquer forma adequada (por exemplo, gel, cristalina, amorfa etc.). Adsorção a esses sais é preferida. As composições que contêm mineral também podem ser formuladas como uma partícula de sal de metal [65]. Adjuvantes de sal de alumínio são descritos em maiores detalhes abaixo.

- uma emulsão óleo-em-água, como descrito em maiores detalhes abaixo.

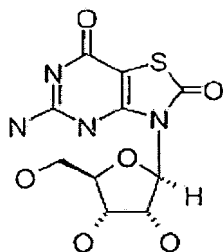
- um oligonucleotídeo imunoestimulante, como descrito em maiores detalhes abaixo.

- 3-O-desacilado monofosforil lipídeo A ('3dMPL', também conhecido como 'MPLTM'), como descrito em maiores detalhes abaixo.

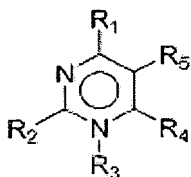
- um composto de imidazoquinolina, como Imiquimod ("R-837") [66,67], Resiquimod ("R-848") [68], e seus análogos; e sais destes (por exemplo, os sais de cloridrato). Detalhes adicionais sobre imidazoquinolinas imunoestimulantes podem ser encontrados nas referências 69 a 73.

- um composto de tio-semicarbazona, como aqueles revelados na referência 74. Métodos de formulação, manufatura e rastreamento por compostos ativos são também descritos na referência 74. As tio-semicarbazonas são particularmente eficazes no estímulo de células mononucleares de sangue periférico humano para a produção de citocinas, como TNF- α .

- um análogo de nucleosídeo, como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



5 e pró-fármacos destes; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) os compostos revelados nas referências 75 a 77; (f) um composto tendo a fórmula:



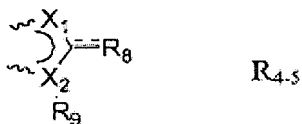
10

em que

R_1 e R_2 são independentemente H, halo, $-NR_aR_b$, $-OH$, C_{1-6} alcoxi, C_{1-6} alcoxi substituído, heterociclil, heterociclil substituído, C_{6-10} aril, C_{6-10} aril substituído, C_{1-6} alquil, ou C_{1-6} alquil substituído;

R_3 é ausente, H, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, C_{6-10} aril, C_{6-10} aril substituído, heterociclil, ou heterociclil substituído;

R_4 e R_5 são independentemente H, halo, heterociclil, heterociclil substituído, $-C(O)-R_d$, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, ou unidos para formar um anel de 5 membros como em R_{4-5} :



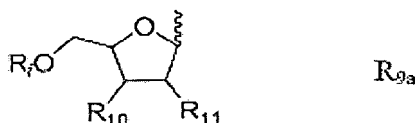
25 A ligação sendo realizada nas ligações indicadas por um ~~~

X_1 e X_2 são independentemente N, C, O ou S;

R_8 é H, halo, $-OH$, C_{1-6} alquil, C_{2-6} alquenil, C_{2-6} alquinil, $-OH$, $-NR_aR_b$, $-(CH_2)_n-O-R_c$, $-O-(C_{1-6}alquil)$, $-S(O)_pR_e$, ou $-C(O)-R_d$;

30

R_9 é H, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil substituído, heterociclílico, heterociclílico substituído ou R_{9a} , em que R_{9a} é:



5 A ligação sendo realizada na ligação indicada por um

~~~~~

$R_{10}$  e  $R_{11}$  são independentemente H, halo,  $C_{1-6}$  alcoxi,  $C_{1-6}$  alcoxi substituído,  $-NR_aR_b$  ou  $-OH$ ;

cada  $R_a$  e  $R_b$  é independentemente H,  $C_{1-6}$  alquil,  $C_{1-6}$  alquil substituído,  $-C(O)R_d$ ,  $C_{6-10}$  aril;

cada  $R_c$  é independentemente H, fosfato, difosfato, trifosfato,  $C_{1-6}$  alquil ou  $C_{1-6}$  alquil substituído;

cada  $R_d$  é independentemente H, halo,  $C_{1-6}$  alquil,  $C_{1-6}$  alquil substituído,  $C_{1-6}$  alcoxi,  $C_{1-6}$  alcoxi substituído,  $-NH_2$ ,  $-NH(C_{1-6}$  alquil),  $-NH(C_{1-6}$  alquil substituído),  $-N(C_{1-6}$  alquil substituído) $_2$ ,  $C_{6-10}$  aril ou heterociclílico;

cada  $R_e$  é independentemente H,  $C_{1-6}$  alquil,  $C_{1-6}$  alquil substituído,  $C_{6-10}$  aril,  $C_{6-10}$  aril substituído, heterociclílico ou heterociclílico substituído;

20 cada  $R_f$  é independentemente H,  $C_{1-6}$  alquil,  $C_{1-6}$  alquil substituído,  $-C(O)R_d$ , fosfato, difosfato ou trifosfato;

cada  $n$  é independentemente 0, 1, 2 ou 3;

cada  $p$  é independentemente 0, 1 ou 2; ou

(g) um sal farmaceuticamente aceitável de qualquer um de (a) a (f), um tautômero de qualquer um de (a) a (f), ou um sal farmaceuticamente aceitável do tautômero.

- um composto de triptantrina, como aqueles revelados na referência 78. Métodos de formulação, manufatura e rastreamento para compostos ativos são também descritos na  
30 referência 78. As tio-semicarbazonas são particularmente

eficazes no estímulo de células mononucleares de sangue periférico humano para a produção de citocinas, como TNF- $\alpha$ .

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [79].

5 - Compostos revelados na referência 80, que incluem: compostos de Acilpiperazina, compostos de Indolediona, compostos de Tetrahidraisoquinolina (THIQ), compostos de Benzociclodiona, compostos de Aminoazavinil, compostos de Aminobenzimidazol quinolinona (ABIQ) [81,82], compostos de  
10 Hidraftalamida, compostos de Benzofenona, compostos de Isoxazol, compostos de Esterol, compostos de Quinazilinona, compostos de Pirrol [83], compostos de Antraquinona, compostos de Quinoxalina, compostos de Triazina, compostos de Pirazalopirimidina, e compostos de Benzazol [84].

15 - Compostos revelados na referência 85, incluindo 3,4-di(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-dionas, análogos de staurosporina, piridazinas derivatizadas, cromen-4-onas, indolinonas, quinazolininas e análogos de nucleosídeo.

- um derivado de aminoalquil glicosaminida fosfato, como  
20 RC-529 [86,87].

- um fosfazeno, como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazeno] ("PCPP"), como descrito, por exemplo, nas referências 88 e 89.

- imunopotenciadores de molécula pequena (SMIPs) como:

25 N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

30 N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

5 N2-butyl-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

N2-butyl-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

10 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina

15 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina

2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol

20 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etil acetato

4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona

N2-butyl-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

25 N2-butyl-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

30 N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

1- {4-amino-2- [metil (propil) amino] -1H-imidazo [4,5-c]quinolin-1-il} -2-metilpropan-2-ol

1- [4-amino-2- (propilamino) -1H-imidazo [4,5-c]quinolin-1-il] -2-metilpropan-2-ol

5 N4,N4-dibenzil-1- (2-metoxi-2-metilpropil) -N2-propil-1H-imidazo [4,5-c]quinolina-2,4-diamina.

- Saponinas [capítulo 22 da ref. 131], que são um grupo heterólogo de glicosídeos de esterol e glicosídeos de triterpenóides que são encontrados na casca, folhas, galhos, raízes e até mesmo nas flores de uma ampla variedade de espécies de plantas. Saponina da casca da árvore *Quillaia saponaria* Molina tem sido amplamente estudada como adjuvante. Saponina também pode ser comercialmente obtida de *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (véu de noiva), e *Saponaria officianalis* (raiz sabão). Formulações com adjuvante de saponina incluem formulações purificadas, como QS21, bem como formulações lipídicas, como ISCOMs. QS21 é comercializado como Stimulon<sup>TM</sup>. Composições de saponina foram purificadas com o uso de HPLC e RP-HPLC. Frações purificadas específicas que usam essas técnicas foram identificadas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QHB e QH-C. Preferivelmente, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é revelado na ref 90. As formulações de saponina também podem compreender um esterol, como colesterol [91]. Combinações de saponinas e colesteróis podem ser usadas para formar partículas únicas chamadas complexos imunoestimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 da ref 131]. ISCOMs tipicamente também incluem um fosfolípideo como fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Qualquer

saponina conhecida pode ser usada em ISCOMs. Preferivelmente, o ISCOM inclui um ou mais de QuilA, QHA & QHC. ISCOMs são também descritos nas refs. 91-93. Opcionalmente, os ISCOMs podem ser desprovidos de  
5 detergente adicional [94]. Uma revisão do desenvolvimento de adjuvantes com base em saponina pode ser encontrada nas refs. 95 & 96.

- toxinas bacterianas de ribosilação de ADP (por exemplo, a enterotoxina instável ao calor de *E. coli* "LT", toxina de  
10 cólera "CT", ou toxina de pertussis "PT") e derivados desintoxicados destas, como as toxinas mutantes conhecidas como LT-K63 e LT-R72 [97]. O uso de toxinas de ribosilação de ADP desintoxicadas como adjuvantes de mucosa é descrito na ref. 98 e como adjuvantes parenterais na ref 99.

15 - bioadesivos e mucoadesivos, como microesferas de ácido hialurônico esterificado [100] ou quitosana e seus derivados [101].

- micropartículas (ou seja, uma partícula de ~100 nm a ~150 µm de diâmetro, mais preferivelmente ~200 nm a ~30 µm de  
20 diâmetro, ou ~500 nm a 10 µm de diâmetro) formadas de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (por exemplo, um ácido poli(α-hidroxi), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona etc.), com poli(lactide-co-glicolídeo)  
25 sendo preferido, opcionalmente tratado para ter uma superfície negativamente carregada (por exemplo, com SDS) ou uma superfície positivamente carregada (por exemplo, com um detergente catiônico, como CTAB).

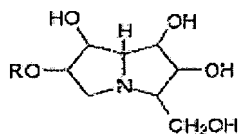
- lipossomos (capítulos 13 & 14 da ref. 131). Exemplos de  
30 formulações em lipossomo adequadas para uso como adjuvantes

são descritas nas refs. 102-104.

- éteres de polioxietileno e ésteres de polioxietileno [105]. Tais formulações também incluem tensoativos de éster de polioxietileno sorbitano em combinação com um octoxinol 5 [106], bem como éteres de polioxietileno alquil ou tensoativos de éster em combinação com pelo menos um tensoativo não-iônico adicional como um octoxinol [107]. Éteres de polioxietileno preferidos são selecionados do seguinte grupo: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), 10 polioxietileno-9-estearil éter, polioxietileno-8-estearil éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter, e polioxietileno-23-lauril éter.
- muramil peptídeos, como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D- 15 isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida ("DTP-DPP", ou "Theramide™"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-nopalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").
- 20 - uma preparação de proteossomo de proteína de membrana externa preparada a partir de uma primeira bactéria Gram-negativa em combinação com uma preparação de lipossacarídeo (LPS) derivada de uma segunda bactéria Gram-negativa, em que as preparações de proteossomo de proteína de membrana 25 externa e de LPS formam um complexo de adjuvante estável não covalente. Tais complexos incluem "IVX908", um complexo que compreende membrana externa de *Neisseria meningitidis* e LPS. Eles têm sido usados como adjuvantes para vacinas de influenza [108].
- 30 - um polímero de polioxiidônio [109,110] ou outro derivado

de polietileno-piperazina N-oxidado.

- metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") [111].
- um composto de pirrolizidina polihidroxilado [112], como um que tem a fórmula:

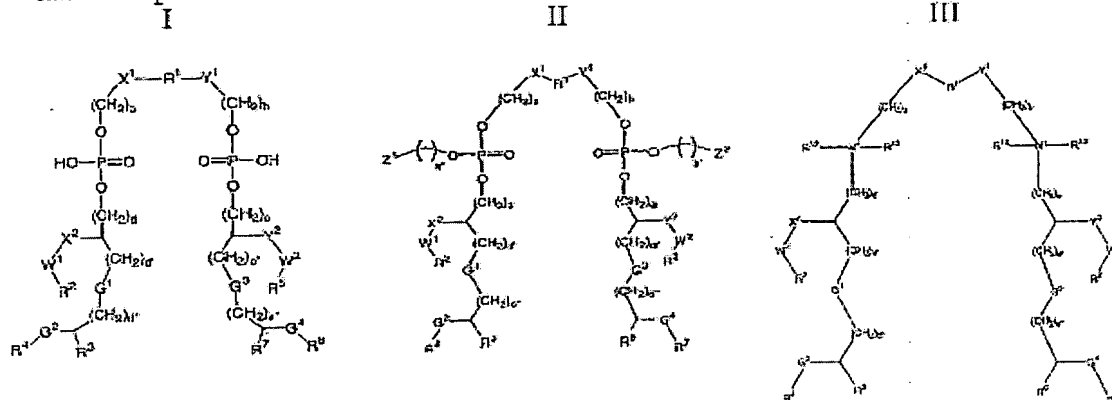


em que R é selecionado do grupo que compreende hidrogênio, grupos acil, alquil (por exemplo, cicloalquil), alquenil, alquinil e aril de cadeia linear ou ramificada, substituídos ou não substituídos, saturados ou insaturados, ou um sal ou derivado farmacologicamente aceitável destes. Exemplos incluem, sem limitação: casuarina, casuarina-6- $\alpha$ -D-glicopiranosose, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepi-casuarina etc.

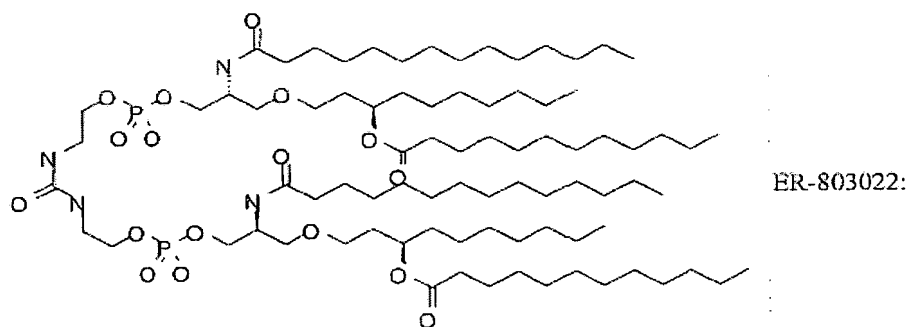
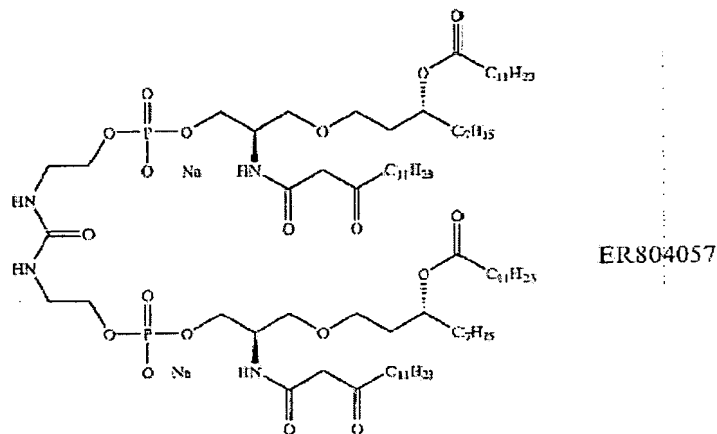
- um ligante de CD1d, como uma  $\alpha$ -glicosilceramida [113-120] (por exemplo,  $\alpha$ -galactosilceramida),  $\alpha$ -glicosilceramidas que contêm fitosfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-( $\alpha$ -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101, 3"-O-sulfo-galactosilceramida etc.

- uma gama inulina [121] ou derivado desta, como algamulina.

- um composto de fórmula I, II ou III, ou um sal deste:



como definido na referência 122, como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 ou 'ER 804057', por exemplo:

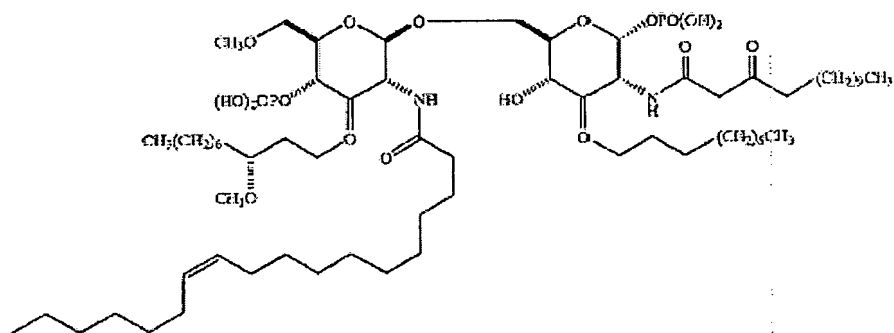


- derivados de lipídeo A de *Escherichia coli* como OM-174 (descrito nas refs. 123 & 124).

20 - uma formulação de um lipídeo catiônico e um co-lipídeo (comumente neutro), como aminopropildimetil-miristoleiloxi-propanamínio brometo-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin<sup>TM</sup>") ou aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanamínio brometodioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Formulações que contêm sais de (+)-N(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradeceneiloxi)-1-propanamínio são preferidas [125].

- compostos que contêm lipídeos ligados a uma estrutura acíclica que contém fosfato, como o agonista TLR4 E5564

30 [126,127]:



Essas e outras substâncias ativas de adjuvante são discutidas em maiores detalhes nas referências 131 & 132.

Os adjuvantes para uso na presente invenção podem ser moduladores e/ou agonistas de receptores *Toll-Like* (TLR). Por exemplo, eles podem ser agonistas de uma ou mais das proteínas humanas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e/ou TLR9. Agentes preferidos são agonistas de TLR7 (por exemplo, imidazoquinolinas) e/ou TLR9 (por exemplo, oligonucleotídeos CpG). Esses agentes são úteis para ativação de vias de imunidade inata.

Uma vacina única pode incluir dois ou mais dos referidos adjuvantes.

Antígenos e adjuvantes em uma composição estarão tipicamente em uma mistura.

#### Adjuvantes de sal de alumínio

Os adjuvantes conhecidos como hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio podem ser usados. Esses nomes são convencionais, mas são usados para conveniência apenas, uma vez que nenhum deles é uma descrição precisa do real composto químico que está presente (por exemplo, veja o capítulo 9 da referência 131). A invenção pode usar qualquer um dos adjuvantes de "hidróxido" ou "fosfato" que estão em uso geral como adjuvantes.

Os adjuvantes conhecidos como "hidróxido de alumínio"

são tipicamente sais de oxihidróxido de alumínio, que são comumente, pelo menos parcialmente, cristalinos. Oxihidróxidos de alumínio, que podem ser representados pela fórmula  $AlO(OH)$ , podem ser distintos de outros compostos de alumínio, como hidróxido de alumínio  $Al(OH)_3$ , por espectroscopia de infravermelho (IR), em particular pela presença de uma banda de adsorção a  $1070\text{ cm}^{-1}$  e um Banda forte (strong shoulder) a  $3090-3100\text{ cm}^{-1}$  [capítulo 9 da ref. 131]. O grau de cristalinidade de um adjuvante de hidróxido de alumínio é refletido pela amplitude da banda de difração em meio peso (WHH), com partículas pouco cristalinas que mostram maior ampliação de linha devido a menores tamanhos de cristalitos. A área de superfície aumenta à medida que WHH aumenta, e os adjuvantes com maiores valores de WHH têm maior capacidade para adsorção de antígeno. Uma morfologia fibrosa (por exemplo, como observado em micrográficos de transmissão de elétrons) é típica para adjuvantes de hidróxido de alumínio. O pI de adjuvantes de hidróxido de alumínio é tipicamente cerca de 11, ou seja, o adjuvante em si tem uma carga de superfície positiva em pH fisiológico. As capacidades adsortivas entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg  $Al^{+++}$  em pH 7,4 foram relatadas para adjuvantes de hidróxido de alumínio.

Os adjuvantes conhecidos como "fosfato de alumínio" são tipicamente hidroxifosfatos de alumínio, freqüentemente também contendo uma pequena quantidade de sulfato (ou seja, hidroxifosfato sulfato de alumínio). Eles também podem ser obtidos por precipitação, e as condições de reação e concentrações durante a precipitação influenciam o grau de substituição de fosfato para hidroxil no sal.

Hidroxifosfatos geralmente têm uma proporção molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0,3 e 1,2. Hidroxifosfatos podem ser distintos de  $\text{AlPO}_4$  pela presença de grupos hidroxil. Por exemplo, uma banda de espectro de IR a  $3164 \text{ cm}^{-1}$  (por exemplo, quando aquecido a  $200^\circ\text{C}$ ) indica a presença de grupos hidroxil estruturais [cap.9 da ref. 131].

A proporção molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$  de um adjuvante de fosfato de alumínio será geralmente entre 0,3 e 1,2, preferivelmente entre 0,8 e 1,2, e mais preferivelmente  $0,95 \pm 0,1$ . O fosfato de alumínio será geralmente amorfo, particularmente para sais de hidroxifosfato. Um adjuvante típico é hidroxifosfato de alumínio amorfo com proporção molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0,84 e 0,92, incluído a  $0,6 \text{ mg Al}^{3+}/\text{ml}$ . O fosfato de alumínio geralmente será particulado (por exemplo, morfologia semelhante à placa como observado em micrográficos de elétron de transmissão). Diâmetros típicos das partículas estão na faixa de  $0,5\text{-}20 \text{ }\mu\text{m}$  (por exemplo, cerca de  $5\text{-}10 \text{ }\mu\text{m}$ ) depois de qualquer adsorção de antígeno. As capacidades adsorptivas entre  $0,7\text{-}1,5 \text{ mg}$  de proteína por  $\text{mg}$  de  $\text{Al}^{+++}$  em pH 7,4 foram relatadas para adjuvantes de fosfato de alumínio.

O ponto de carga zero (PZC) de fosfato de alumínio é inversamente relacionado ao grau de substituição de fosfato por hidroxil, e esse grau de substituição pode variar dependendo das condições de reação e concentração de reagentes usada para a preparação do sal por precipitação. PZC é também alterado por mudança na concentração de íons de fosfato livres em solução (mais fosfato = mais PZC ácido) ou por adição de um tampão como um tampão de histidina (torna o PZC mais básico). Fosfatos de alumínio

usados de acordo com a invenção terão geralmente um PZC entre 4,0 e 7,0, mais preferivelmente entre 5,0 e 6,5 por exemplo, cerca de 5,7.

As suspensões de sais de alumínio usadas para preparar  
5 composições da invenção podem conter um tampão (por exemplo, um tampão de fosfato ou histidina ou Tris), mas esse não é sempre necessário. As suspensões são preferivelmente estéreis e livres de pirógeno. A suspensão pode incluir íons livres de fosfato aquoso, por exemplo,  
10 presentes em uma concentração entre 1,0 e 20 mM, preferivelmente entre 5 e 15 mM, e mais preferivelmente cerca de 10 mM. As suspensões também podem compreender cloreto de sódio.

A invenção pode usar uma mistura de um hidróxido de  
15 alumínio e um fosfato de alumínio. Nesse caso pode haver mais fosfato de alumínio que hidróxido, por exemplo, uma proporção de peso de pelo menos 2:1, por exemplo,  $\geq 5:1$ ,  $\geq 6:1$ ,  $\geq 7:1$ ,  $\geq 8:1$ ,  $\geq 9:1$  etc.

A concentração de  $Al^{+++}$  na composição para  
20 administração a um paciente é preferivelmente menor que 10 mg/ml, por exemplo,  $\leq 5$  mg/ml,  $\leq 4$  mg/ml,  $\leq 3$  mg/ml,  $\leq 2$  mg/ml,  $\leq 1$  mg/ml etc. Uma faixa preferida está entre 0,3 e 1 mg/ml. Um máximo de 0,85 mg/dose é preferido.

#### **Adjuvantes de emulsão óleo-em-água**

25 Constatou-se que as emulsões óleo-em-água são particularmente adequadas para uso em vacinas de vírus influenza com adjuvante. Várias de tais emulsões são conhecidas, e elas incluem tipicamente pelo menos um óleo e pelo menos um tensoativo, com o óleo(s) e tensoativo(s)  
30 sendo biodegradáveis (metabolisáveis) e biocompatíveis. As

gotículas de óleo na emulsão têm geralmente menos que 5  $\mu$ m de diâmetro, e ter um diâmetro até mesmo na escala sub-mícron, com esses pequenos tamanhos sendo atingidos com um microfluidificador para fornecer emulsões estáveis. As  
5 gotículas com um tamanho menor que 220 nm são preferidas uma vez que elas podem ser individualizadas para esterilização em filtro.

A invenção pode ser usada com óleos como aqueles de um animal (como peixe) ou de fonte vegetal. As fontes para  
10 óleos vegetais incluem nozes, sementes e grãos. Óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de coco, e óleo de oliva, os mais comumente disponíveis, exemplificam os óleos de noz. Óleo de jojoba pode ser usado, por exemplo, obtido da fava de jojoba. Óleos de semente incluem óleo de açafrão, óleo  
15 de algodão, óleo de semente de girassol, óleo de semente de gergelim e outros. No grupo de grãos, o óleo de milho é o mais facilmente disponível, mas o óleo de outros grãos cereais como trigo, aveias, centeio, arroz, teff, tritcale e outros também pode ser usado. Ésteres de ácido graxo de  
20 6-10 carbonos de glicerol e 1,2-propanodiol, embora não ocorram naturalmente em óleos de semente, podem ser preparados por hidrólise, separação e esterificação dos materiais adequados iniciado a partir do óleo da noz e semente. Gorduras e óleos de leite de mamífero são  
25 metabolizáveis e podem ser, portanto, usados na prática dessa invenção. os procedimentos para separação, purificação, saponificação e outros meios necessários para obtenção de óleos puros a partir de fontes animais são bem conhecidos na técnica. A maior parte dos peixes contém  
30 óleos metabolizáveis que podem ser facilmente recuperados.

Por exemplo, óleo de fígado de bacalhau, óleo de fígado de tubarão, e óleo de baleia como espermacete exemplificam vários dos óleos de peixe que podem ser usados nessa. Inúmeros óleos de cadeia ramificada são sintetizados bioquimicamente em unidades de 5-carbono isopreno e são geralmente referidos como terpenóides. Óleo de fígado de tubarão contém um terpenóide ramificado, insaturado chamado esqualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que é particularmente preferido nessa. Esqualano, o análogo saturado de esqualeno, é também um óleo preferido. Óleos de peixe, incluindo esqualeno e esqualano, são facilmente disponíveis de fontes comerciais ou podem ser obtidos por métodos conhecidos na técnica. Outros óleos preferidos são os tocoferóis (veja abaixo). Misturas de óleos podem ser usadas.

Tensoativos podem ser classificados por seu 'FILB' (equilíbrio hidrofílico/lipofílico). Tensoativos preferidos da invenção têm um HLB de pelo menos 10, preferivelmente pelo menos 15, e mais preferivelmente pelo menos 16. A invenção pode ser usada com tensoativos que incluem, sem limitação: os tensoativos de ésteres de polioxietileno sorbitano (comumente referidos como os Tweens), especialmente polissorbato 20 e polissorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), e/ou óxido de butileno (BO), vendidos sob o nome comercial DOWFAX™, como copolímeros em bloco linear EO/PO; octoxinóis, que podem variar no número de grupos etoxi de repetição (oxi-1,2-etanodiil), com octoxinol-9 (Triton X-100, ou t-octilfenoxipolietoxietanol) sendo de interesse particular; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-

40); fosfolipídeos como fosfatidilcolina (lecitina);  
nonilfenol etoxilatos, como Tergitol<sup>TM</sup> série NP; os éteres  
graxos de polioxietileno derivados de lauril, cetil,  
estearil e oleil alcoóis (conhecidos como tensoativos  
5 Brij), como trietilenoglicol monolauril éter (Brij 30); e  
ésteres de sorbitano (comumente conhecidos como SPANs),  
como trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaurato de  
sorbitano. Tensoativos não iônicos são preferidos.  
Tensoativos preferidos para inclusão na emulsão são Tween  
10 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano), Span 85  
(trioleato de sorbitano), lecitina e Triton X-100.

Misturas de tensoativos podem ser usadas, por exemplo,  
misturas de Tween 80/Span 85. Uma combinação de um éster de  
polioxietileno sorbitano como monooleato de polioxietileno  
15 sorbitano (Tween 80) e um octoxinol como t-  
octilfenoxipoliethoxietanol (Triton X-100) é também  
adequada. Uma outra combinação útil compreende laureth 9  
mais um éster de polioxietileno sorbitano e/ou um  
octoxinol.

20 Quantidades preferidas de tensoativos (% em peso) são:  
ésteres de polioxietileno sorbitano (como Tween 80) 0,01 a  
1%, em particular cerca de 0,1%; octil- ou nonilfenoxi  
polioxietanóis (como Triton X-100, ou outros detergentes na  
série Triton) 0,001 a 0,1%, em particular 0,005 a 0,02%;  
25 éteres de polioxietileno (como laureth 9) 0,1 a 20%,  
preferivelmente 0,1 a 10% e em particular 0,1 a 1% ou cerca  
de 0,5%.

Adjuvantes específicos de emulsão óleo-em-água úteis  
com a invenção incluem, sem limitação:

30 - uma emulsão sub-mícron de esqualeno, Tween 80, e

Span 85. A composição da emulsão em volume pode ser cerca de 5% esqualeno, cerca de 0,5% polissorbato 80 e cerca de 0,5% Span 85. Em termos de peso, essas proporções se tornam 4,3% esqualeno, 0,5% polissorbato 80 e 0,48% Span 85. Esse

5 adjuvante é conhecido como 'MF59' [128-130], como descrito me maiores detalhes no capítulo 10 da ref. 131 e capítulo 12 da ref. 132. A emulsão MF59 inclui vantajosamente íons de citrato, por exemplo, 10mM de tampão de citrato de sódio.

10 - uma emulsão de esqualeno, tocoferol, e Tween 80. A emulsão pode incluir solução salina tamponada por fosfato. Ela pode também incluir Span 85 (por exemplo, a 1%) e/ou lecitina. Essas emulsões podem ter de 2 a 10% esqualeno, de 2 a 10% tocoferol e de 0,3 a 3% Tween 80, e a proporção de

15 peso de esqualeno:tocoferol é preferivelmente  $\leq 1$  uma vez que essa fornece uma emulsão mais estável. Esqualeno e Tween 80 podem estar presentes em uma proporção de volume de cerca de 5:2. Uma tal emulsão pode ser feita por dissolução de Tween 80 em PBS para gerar uma solução a 2%,

20 então mistura de 90 ml dessa solução com uma mistura de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol e 5 ml de esqualeno), então microfluidificação da mistura. A emulsão resultante pode ter gotículas de óleo sub-mícron, por exemplo, com um diâmetro médio entre 100 e 250 nm, preferivelmente cerca de

25 180 nm.

- uma emulsão de esqualeno, tocoferol, e um detergente de Triton (por exemplo, Triton X-100). A emulsão também pode incluir um 3d-MPL (veja abaixo). A emulsão pode conter um tampão de fosfato.

30 - uma emulsão que compreende um polissorbato (por exemplo,

polissorbato 80), um detergente de Triton (por exemplo, Triton X-100) e um tocoferol (por exemplo, um succinato de  $\alpha$ -tocoferol). A emulsão pode incluir esses três componentes em uma proporção de massa de cerca de 75:11:10 (por exemplo, 750  $\mu\text{g/ml}$  de polissorbato 80, 110  $\mu\text{g/ml}$  de Triton X-100 e 100  $\mu\text{g/ml}$  de succinato de  $\alpha$ -tocoferol), e essas concentrações devem incluir qualquer contribuição desses componentes de antígenos. A emulsão também pode incluir esqualeno. A emulsão também pode incluir um 3d-MPL (veja abaixo). A fase aquosa pode conter um tampão de fosfato.

- uma emulsão de esqualano, polissorbato 80 e poloxâmero 401 ("Pluronic<sup>TM</sup> L121"). A emulsão pode ser formulada em solução salina tamponada por fosfato, pH 7,4. Essa emulsão é um veículo de liberação útil para muramil dipeptídeos, e tem sido usado com tlifeonil-MDP no adjuvante "SAF-1" [133] (0,05-1% Thr-MDP, 5% esqualano, 2,5% Pluronic L121 e 0,2% polissorbato 80). Ele também pode ser usado sem o Thr-MDP, como no adjuvante "AF" [134] (5% esqualano, 1,25% Pluronic L121 e 0,2% polissorbato 80). Microfluidificação é preferida.

- uma emulsão que compreende esqualeno, um solvente aquoso, um tensoativo não iônico de éter de polioxietileno alquil (por exemplo, polioxietileno (12) cetostearil éter) e um tensoativo não iônico hidrofóbico (por exemplo, um éster de sorbitano ou éster de manide, como monoleato de sorbitano ou 'Span 80'). A emulsão é preferivelmente termo-reversível e/ou tem pelo menos 90% das gotículas de óleo (em volume) com um tamanho de menos que 200 nm [135]. A emulsão também pode incluir um ou mais de alditol; um agente crioprotetor

(por exemplo, um açúcar, como dodecilmaltoside e/ou sacarose); e/ou um alquilpoliglicosídeo. Tais emulsões podem ser liofilizadas.

- uma emulsão que tem de 0,5-50% de um óleo, 0,1-10% de um fosfolipídeo, e 0,05-5% de um tensoativo não iônico. Como descrito na referência 136, componentes de fosfolipídeo preferidos são fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomiéline e cardiolipina. Os tamanhos das gotículas sub-mícron são vantajosos.

- uma emulsão óleo-em-água sub-mícron de um óleo não metabolizável (como óleo mineral leve) e pelo menos um tensoativo (como lecitina, Tween 80 ou Span 80). Aditivos podem ser incluídos como QuilA saponina, colesterol, um conjugado saponina-lipófilo (como GPI-0100, descrito na referência 137, produzido por adição de amina alifática a desacilsaponina por meio do grupo carboxil de ácido glicurônico), brometo de dimetildioctadecilamônio e/ou N,N-dioctadecilN,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.

- uma emulsão em que uma saponina (por exemplo, QuilA ou QS21) e um esterol (por exemplo, um colesterol) são associados como micelas helicoidais [138].

- uma emulsão que compreende um óleo mineral, um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico, e um tensoativo hidrofílico não iônico (por exemplo, um álcool graxo etoxilado e/ou copolímero em bloco de polioxietilenopolioxipropileno) [139].

- Uma emulsão que compreende um óleo mineral, um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico, e um tensoativo lipofílico não iônico (por exemplo, um álcool graxo

etoxilado e/ou copolímero em bloco de polioxietilenopolioxipropileno) [139].

As emulsões podem ser misturadas com antígeno extemporaneamente, no momento da liberação. Assim, o  
5 adjuvante e antígeno podem ser mantidos separadamente em uma vacina embalada ou distribuída, pronta para formulação final no momento do uso. O antígeno estará geralmente em uma forma aquosa, de modo que a vacina é finalmente preparada por mistura de dois líquidos. A proporção de  
10 volume dos dois líquidos pode variar (por exemplo, entre 5:1 e 1:5) mas é geralmente cerca de 1:1.

Depois de o antígeno e adjuvante terem sido misturados, o antígeno de hemaglutinina geralmente permanecerá em solução aquosa mas pode se distribuir ao  
15 redor da interface óleo/água. Em geral, pouca, se houver, hemaglutinina entrará na fase oleosa de uma emulsão.

Quando a composição inclui um tocoferol, qualquer um de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , ou  $\xi$  tocoferóis podem ser usados, mas  $\alpha$ -  
20 tocoferóis são preferidos. O tocoferol pode tomar várias formas, por exemplo, diferentes sais e/ou isômeros. Sais incluem sais orgânicos, como succinato, acetato, nicotinato etc. D- $\alpha$ -tocopherol e DL- $\alpha$ -tocopherol também podem ser usados. Tocoferóis são vantajosamente incluídos em vacinas para uso em pacientes mais idosos (por exemplo, de 60 anos  
25 ou mais) porque foi relatado que a vitamina E tem um efeito positivo sobre a resposta imune nesse grupo de pacientes [140]. Ela também pode ter propriedades antioxidantes que podem ajudar a estabilizar as emulsões [141]. Um  $\alpha$ -  
30 tocoferol preferido é DL- $\alpha$ -tocopherol, e o sal preferido desse tocoferol é o succinato. Foi constatado que o sal de

succinato coopera com ligantes relacionados a TNF *in vivo*. Além disso, succinato de  $\alpha$ -tocoferol é conhecido por ser compatível com vacinas de influenza e por ser um conservante útil como uma alternativa a compostos mercuriais [10].

### Oligonucleotídeos imunoestimulantes

Oligonucleotídeos imunoestimulantes podem incluir modificações de nucleotídeo/análogos como modificações de fosforotioato e podem ser de filamento duplo ou (exceto por RNA) de filamento único. Referências 142, 143 e 144 revelam possíveis substituições de análogo, por exemplo, substituição de guanossina com T-desoxi-7-deazaguanossina. O efeito de adjuvante de oligonucleotídeos CpG é também discutido nas refs. 145-150. Uma sequência de CpG pode ser direcionada a TLR9, como o motivo GTCGTT ou TTCGTT [151]. A sequência de CpG pode ser específica para indução de uma resposta imune de Th1, como CpG-A ODN (oligodesoxinucleotídeo), ou ela pode ser mais específica para indução de uma resposta de célula B, como CpGB ODN. CpG-A e CpG-B ODNs são discutidos nas refs. 152-154. Preferivelmente, o CpG é um CpG-A ODN. Preferivelmente, o oligonucleotídeo CpG é construído de modo que a extremidade 5' é acessível para reconhecimento de receptor. Opcionalmente, duas sequências de oligonucleotídeo CpG podem ser anexadas em suas extremidades 3' para formar "imunômeros". Veja, por exemplo, as referências 151 e 155-157. Um adjuvante de CpG útil é CpG7909, também conhecido como ProMune<sup>TM</sup> (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

Como uma alternativa, ou em adição, ao uso de sequências de CpG, as sequências de TpG podem ser usadas

[158]. Esses oligonucleotídeos podem ser livres de motivos CpG não metilados.

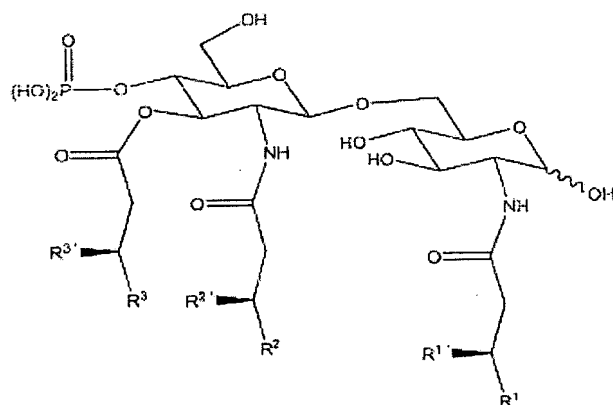
O oligonucleotídeo imunoestimulante pode ser rico em pirimidina. Por exemplo, ele pode compreender mais que um nucleotídeo consecutivo de timidina (por exemplo, TITT, como revelado na ref. 158), e/ou ele pode ter uma composição de nucleotídeos com >25% de timidina (por exemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80% etc.). Por exemplo, ele pode compreender mais que um nucleotídeo consecutivo de citosina (por exemplo, CCCC, como revelado na ref. 158), e/ou ele pode ter uma composição de nucleotídeos com >25% citosina (por exemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80% etc.). Esses oligonucleotídeos podem ser livres de motivo de CpG não metilados.

Oligonucleotídeos imunoestimulantes tipicamente compreenderão pelo menos 20 nucleotídeos. Eles podem compreender menos que 100 nucleotídeos.

### 3 de-O-acilado monofosforil lipídeo A

3dMPL (também conhecido como 3 de-O-acilado monofosforil lipídeo A ou 3-O-desacil-4'-monofosforil lipídeo A) é um adjuvante em que a posição 3 da glicosamina da extremidade de redução em monofosforil lipídeo A foi desacilada. 3dMPL foi preparado a partir de um mutante sem heptose de *Salmonella minnesota*, e é quimicamente similar ao lipídeo A mas é desprovido de um grupo fosforil instável em ácido e um grupo acil instável em base. Ele ativa células da linhagem de monócitos/macrófagos e estimula a liberação de várias citocinas, incluindo IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  e GM-CSF (veja também a ref. 159). A preparação de 3dMPL foi originalmente descrita na referência 160.

3dMPL pode tomar a forma de uma mistura de moléculas relacionadas, que variam em sua acilação (por exemplo, tendo 3, 4, 5 ou 6 cadeias de acil, que podem ser de diferentes comprimentos). Os dois monossacarídeos de glicosaminas (também conhecidos como 2-desoxi-2-amino-glicose) são N-acilados em seus carbonos de posição 2 (ou seja nas posições 2 e 2'), e também há O-acilação na posição 3'. O grupo anexado ao carbono 2 tem fórmula  $\text{-NH-CO-CH}_2\text{-CR}^1\text{R}^{1'}$ . O grupo anexado ao carbono 2' tem fórmula  $\text{-NH-CO-CH}_2\text{-CR}^2\text{R}^{2'}$ . O grupo anexado ao carbono 3' tem fórmula  $\text{-O-CO-CH}_2\text{-CR}^3\text{R}^{3'}$ . Uma estrutura representativa é:



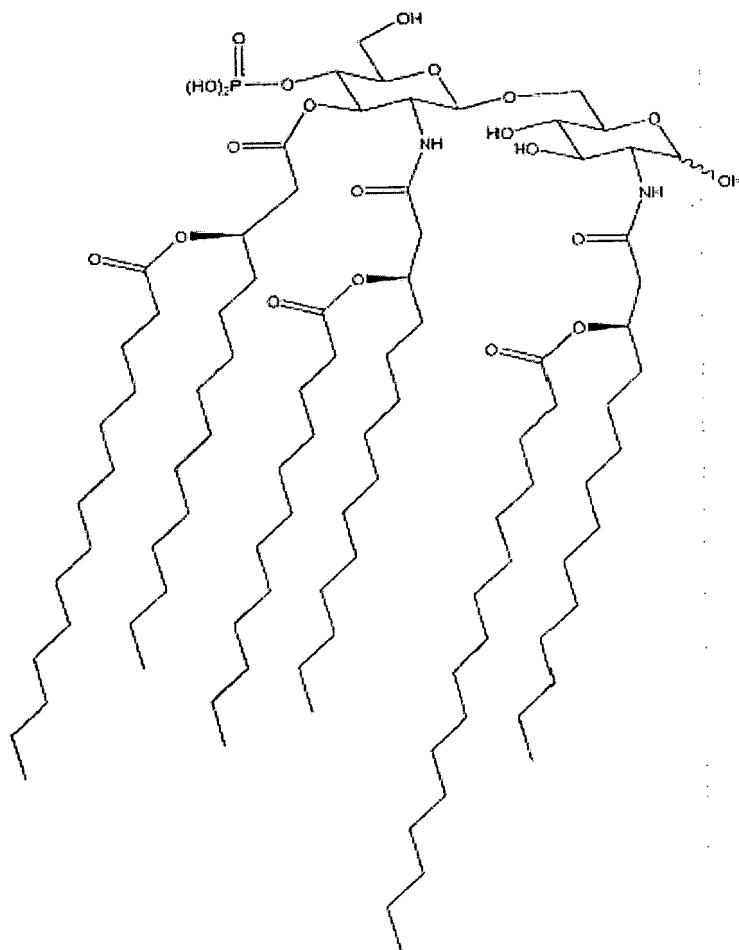
Grupos  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  e  $\text{R}^3$  são independentemente  $\text{-(CH}_2)_n\text{-CH}_3$ . O valor de  $n$  é preferivelmente entre 8 e 16, mais preferivelmente entre 9 e 12, e é mais preferivelmente 10.

Grupos  $\text{R}^{1'}$ ,  $\text{R}^{2'}$  e  $\text{R}^{3'}$  podem ser independentemente: (a)  $\text{-H}$ ; (b)  $\text{-OH}$ ; ou (c)  $\text{-O-CO-R}^4$ , em que  $\text{R}^4$  é  $\text{-H}$  ou  $\text{-(CH}_2)_m\text{-CH}_3$ , em que o valor de  $m$  é preferivelmente entre 8 e 16, e é mais preferivelmente 10, 12 ou 14. Na posição 2,  $m$  é preferivelmente 14. Na posição 2',  $m$  é preferivelmente 10. Na posição 3',  $m$  é preferivelmente 12. Grupos  $\text{R}^{1'}$ ,  $\text{R}^{2'}$  e  $\text{R}^{3'}$  são assim preferivelmente grupos  $\text{-O-acil}$  de ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico ou ácido hexadecanóico.

Quando todos  $\text{R}^{1'}$ ,  $\text{R}^{2'}$  e  $\text{R}^{3'}$  são  $\text{-H}$  então 3dMPL tem

apenas 3 cadeias de acil (um em cada posição 2, 2' e 3'). Quando apenas dois de R<sup>1'</sup>, R<sup>2'</sup> e R<sup>3'</sup> são -H então 3dMPL pode ter 4 cadeias de acil. Quando apenas um de R<sup>1'</sup>, R<sup>2'</sup> e R<sup>3'</sup> é -H então 3dMPL pode ter 5 cadeias de acil. Quando nenhum de R<sup>1'</sup>, R<sup>2'</sup> e R<sup>3'</sup> é -H então 3dMPL pode ter 6 cadeias de acil. O adjuvante 3dMPL usados de acordo com a invenção pode ser uma mistura dessas formas, com de 3 a 6 cadeias de acil, mas é preferível incluir 3dMPL com 6 cadeias de acil na mistura, e em particular para assegurar que a forma de cadeia hexaacil seja pelo menos 10% em peso do 3dMPL total, por exemplo, ≥20%, ≥30%, ≥40%, ≥50% ou mais. 3dMPL com 6 cadeias de acil é a forma mais ativa de adjuvante.

Portanto, a forma mais preferida de 3d1VIPL para inclusão nas composições da invenção é:



Em que 3dMPL é usado na forma de uma mistura, então referências a quantidades ou concentrações de 3dMPL nas composições da invenção referem-se a espécies combinadas de 3dMPL na mistura.

5 Em condições aquosas, 3dMPL pode formar agregados micelares ou partículas com diferentes tamanhos, por exemplo, com um diâmetro  $<150$  nm ou  $>500$  nm. Cada um ou ambos podem ser usados com a invenção, e as melhores partículas podem ser selecionadas por ensaio rotineiro.

10 Partículas menores (por exemplo, pequenas o suficiente para gerar uma suspensão aquosa transparente de 3dMPL) são preferidas para uso com a invenção por causa de sua atividade superior [161]. Partículas preferidas têm um diâmetro médio menor que 220 nm, mais preferivelmente menor

15 que 200 nm ou menor que 150 nm ou menor que 120 nm, e podem ter ainda um diâmetro médio menor que 100 nm. Na maioria dos casos, no entanto, o diâmetro médio não será menor que 50 nm. Essas partículas são pequenas o suficiente para serem adequadas para esterilização em filtro. O diâmetro da

20 partícula pode ser avaliado pela técnica rotineira de dispersão de luz dinâmica, que revela um diâmetro médio de partícula. Quando uma partícula tem um diâmetro de  $x$  nm, haverá geralmente uma distribuição de partículas por volta dessa média, mas pelo menos 50% em número (por exemplo,

25  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 90\%$ , ou mais) das partículas terão um diâmetro na faixa de  $x \pm 25\%$ .

3dMPL pode ser vantajosamente usado em combinação com uma emulsão óleo-em-água. Substancialmente todo o 3dMPL pode estar localizado na fase aquosa da emulsão.

30 O 3dMPL pode ser usado por si só, ou em combinação com

um ou mais compostos adicionais. Por exemplo, é conhecido o uso de 3dMPL em combinação com a saponina QS21 [162] (incluindo em uma emulsão óleo-em-água [163]), com um oligonucleotídeo imunoestimulante, com QS21 e um  
5 oligonucleotídeo imunoestimulante, com fosfato de alumínio [164], com hidróxido de alumínio [165], ou com ambos fosfato de alumínio e hidróxido de alumínio.

#### **Regimes de adjuvantes preferidos**

Os regimes de dosagem da invenção envolvem uma  
10 administração inicial de uma vacina de influenza com adjuvante. Adjuvantes preferidos para uso nessa vacina inicial são emulsões óleo-em-água.

A segunda dose de um regime de 2 doses é preferivelmente sem adjuvante. Como uma alternativa, ela  
15 pode ter adjuvante, mas com um diferente adjuvante da primeira dose. Quando a primeira dose tem adjuvante com uma emulsão óleo-em-água, um adjuvante preferido para uso com uma segunda dose com adjuvante compreende um sal de alumínio.

#### **20 Composições farmacêuticas**

Composições da invenção são farmacêuticamente aceitáveis e estão tipicamente em forma aquosa. Elas podem incluir componentes em adição ao antígeno (e, quando aplicável, o adjuvante), por exemplo, elas tipicamente  
25 incluem um ou mais veículos farmacêuticos e/ou excipientes. Uma discussão completa de tais componentes é disponível na referência 166.

A composição pode incluir conservantes como timerosal ou 2-fenoxietanol. É preferível, no entanto, que a vacina  
30 deva ser substancialmente livre de (ou seja menos que 5

µg/ml) de material mercurial por exemplo, livre de timerosal [10,167]. Vacinas que não contêm mercúrio são mais preferidas. Vacinas livres de conservantes são particularmente preferidas.

5        Para controlar a tonicidade, é preferível incluir um sal fisiológico, como um sal de sódio. Cloreto de sódio (NaCl) é preferido, que pode estar presente entre 1 e 20 mg/ml. Outros sais que podem estar presentes incluem cloreto de potássio, dihidrogênio fosfato de potássio,  
10        fosfato dehidrato dissódico, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio etc.

      As composições terão geralmente uma osmolaridade entre 200 mOsm/kg e 400 mOsm/kg, preferivelmente entre 240-360 mOsm/kg, e estarão mais preferivelmente na faixa de 290-310  
15        mOsm/kg. A osmolaridade foi previamente relatada como não tendo um impacto sobre a dor causada pela vacinação [168], mas, todavia, é preferível manter a osmolaridade nessa faixa.

      As composições podem incluir um ou mais tampões.  
20        Tampões típicos incluem: um tampão de fosfato; um tampão Tris; um tampão de borato; um tampão de succinato; um tampão de histidina (particularmente com um adjuvante de hidróxido de alumínio); ou um tampão de citrato. Tampões serão tipicamente incluídos na faixa de 5-20 mM.

25        O pH da composição será geralmente entre 5,0 e 8,1, e mais tipicamente entre 6,0 e 8,0 por exemplo, entre 6,5 e 7,5, entre 7,0 e 7,8. Um processo da invenção pode incluir portanto, uma etapa de ajuste do pH da vacina bruta antes da embalagem.

30        A composição é preferivelmente estéril. A composição é

preferivelmente não pirogênica, por exemplo, contendo <1 EU (unidade de endotoxina, uma medida padrão) por dose, e preferivelmente <0,1 EU por dose. A composição é preferivelmente livre de glúten.

5 A composição pode incluir material para uma imunização única, ou pode incluir material para imunizações múltiplas (ou seja, um kit de 'multidose'). A inclusão de um conservante é preferível em arranjos de multidose. Como uma alternativa (ou em adição à inclusão de conservante em  
10 composições de multidose, as composições podem ser contidas em um recipiente que tem um adaptador asséptico para remoção de material.

As vacinas de influenza são tipicamente administradas em um volume de dosagem de cerca de 0,5 ml, embora uma meia  
15 dose (ou seja cerca de 0,25 ml) possa ser administrada a crianças (por exemplo, até 36 meses de idade).

As composições e kits são preferivelmente estocados entre 2°C e 8°C. Eles não devem ser congelados. Eles devem ser mantidos idealmente longe de luz direta.

## 20 Kits da invenção

A invenção inclui kits da primeira vacinas de influenza e vacinas adicionais. Um componente do kit será uma primeira vacina com adjuvante, e um outro componente do kit será uma vacina adicional, opcionalmente com adjuvante.  
25 Os dois componentes serão mantidos separadamente, uma vez que eles são administrados a um paciente em tempos substancialmente diferentes.

Cada vacina individual em um kit pode ser pronta para uso, ou pode ser pronta para preparação extemporânea no  
30 momento da liberação. Esse arranjo extemporâneo permite que

o adjuvante e o antígeno sejam mantidos separadamente até o momento do uso, que é particularmente útil quando da utilização de um adjuvante de emulsão óleo-em-água.

Quando a vacina é preparada extemporaneamente, seus  
5 componentes são fisicamente separados um do outro no kit, e  
essa separação pode ser realizada de várias formas. Por  
exemplo, os dois componentes podem estar em dois  
recipientes separados, como frascos. Os conteúdos dos dois  
frascos podem ser então misturados, por exemplo, por  
10 remoção do conteúdo de um frasco e adição ao outro frasco,  
ou por remoção separada dos conteúdos de ambos os frascos e  
mistura deles em um terceiro recipiente. Em um arranjo  
preferido, um dos componentes do kit está em uma seringa e  
o outro está em um recipiente como um frasco. A seringa  
15 pode ser usada (por exemplo, com uma agulha) para inserir  
seu conteúdo no segundo recipiente para mistura, e a  
mistura pode ser então retirada pela seringa. Os conteúdos  
misturados da seringa podem ser então administrados a um  
paciente, tipicamente através de um nova agulha estéril. A  
20 embalagem de um componente em uma seringa elimina a  
necessidade de uso de uma seringa separada para  
administração ao paciente.

Em um outro arranjo preferido, os dois componentes da  
vacina são mantidos unidos mas separadamente na mesma  
25 seringa, por exemplo, uma seringa de câmara dupla, como  
aquelas reveladas nas referências 169-176 etc. Quando a  
seringa é ativada (por exemplo, durante a administração a  
um paciente) então os conteúdos das duas câmaras são  
misturados. Esse arranjo evita a necessidade por uma etapa  
30 separada de mistura no momento do uso.

Quando a vacina é preparada extemporaneamente, seus componentes estarão geralmente em uma forma aquosa. Em alguns arranjos, um componente (tipicamente o componente do antígeno em vez do componente do adjuvante) está em forma seca (por exemplo, em uma forma liofilizada), com o outro componente estando em forma aquosa. Os dois componentes podem ser misturados para reativar o componente seco de gerar uma composição aquosa para administração a um paciente. Um componente liofilizado estará tipicamente localizado em um frasco em vez de uma seringa. Componentes secos podem incluir estabilizantes como lactose, sacarose ou manitol, bem como misturas desses, por exemplo, misturas de lactose/sacarose, misturas de sacarose/manitol etc. um arranjo possível usa um componente de adjuvante em uma seringa pré-preenchida e um componente de antígeno liofilizado em um frasco.

#### **Embalagem das composições ou componentes do kit**

Recipientes adequados para composições da invenção (ou componentes do kit) incluem frascos, seringas (por exemplo, seringas descartáveis), sprays nasais etc. Esses recipientes devem ser estéreis.

Quando a composição/componente é localizado em uma frasco, o frasco é preferivelmente feito de um vidro ou material plástico. O frasco é preferivelmente esterilizado antes de a composição ser adicionada a ele. Ara evitar problemas com pacientes sensíveis ao látex, os frascos são preferivelmente selados com uma tampa livre de látex, e a ausência de látex em todos material da embalagem é preferida. O frasco pode incluir uma dose única de vacina, ou ele pode incluir mais que uma dose (um frasco de

'multidose') por exemplo, 10 doses. Frascos preferidos são feitos de vidro incolor.

Um frasco pode ter um tampo (por exemplo, um fecho Luer) adaptado de modo que uma seringa pré-preenchida possa ser inserida no tampo, os conteúdos da seringa podem ser expelidos no frasco (por exemplo, para reconstituir material liofilizado nesse), e os conteúdos do frasco podem ser removidos de volta à seringa. Após remoção da seringa do frasco, uma agulha pode ser anexada e a composição pode ser administrada a um paciente. O tampo está preferivelmente localizado por dentro de um selante ou cobertura, de modo que o selante ou cobertura tenha que ser removido antes que o tampo possa ser acessado. Um frasco pode ter um tampo que permita a remoção asséptica de seus conteúdos, particularmente para frascos de multidose.

Quando a composição/componente é embalado em uma seringa, a seringa pode ter uma agulha anexada a ela. Se a agulha não é anexada, uma agulha separada pode ser suprida com a seringa para montagem e uso. Tal agulha pode ter uma bainha. Agulhas de segurança são preferidas. Agulhas de 1 polegada calibre 23, 1 polegada calibre 25 e 5/8 de polegada calibre 25 são típicas. Seringas podem ser fornecidas com rótulos destacáveis em que o número do lote, estação de influenza e data de validade do conteúdo podem ser impressos, para facilitar a manutenção registrada. O êmbolo na seringa preferivelmente tem um freio para prevenir que o êmbolo seja acidentalmente removido durante a aspiração. A seringas pode ter um tampo e/ou êmbolo de borracha de látex. Seringas descartáveis contêm uma única dose de vacina. A seringa terá geralmente uma tampa da

ponta para selar a ponta antes da anexação de uma agulha, e a tampa da ponta é preferivelmente feita de uma borracha de butila. Se a seringa e agulha são embaladas separadamente então a agulha é preferivelmente ajustada com uma proteção  
5 de borracha de butila. Seringas preferidas são aquelas comercializadas sob o nome comercial "Tip-Lok"™.

Os recipientes podem ser marcados para mostrar um volume de meia dose, por exemplo, para facilitar a aplicação a crianças. Por exemplo, a seringa que contém ma  
10 dose de 0,5 ml pode ter uma marca que mostra um volume de 0,25 ml.

Quando um recipiente de vidro (por exemplo, uma seringa ou um frasco) é usado, então é preferível usar um recipiente feito de um vidro de borossilicato em vez de um  
15 de vidro tipo "soda-lime".

Um kit ou composição pode ser embalado (por exemplo, na mesma caixa) com um folheto que inclui detalhes da vacina, por exemplo, instruções para administração, detalhes dos antígenos na vacina etc. As instruções também  
20 podem conter avisos, por exemplo, para manter uma solução de adrenalina prontamente disponível em caso de reação anafilática após a vacinação etc.

#### **Métodos de tratamento, e administração da vacina**

As composições da invenção são adequadas para  
25 administração a pacientes humanos. A resposta imune que surge de acordo com a invenção incluirá geralmente uma resposta de anticorpo, preferivelmente uma resposta de anticorpo protetor. Métodos para avaliação das respostas de anticorpo, capacidade de neutralização e proteção após  
30 vacina de vírus influenza são bem conhecidos na técnica.

Estudos em humanos mostraram que os títulos de anticorpo contra hemaglutinina de vírus influenza humano são correlacionados com a proteção (um título de inibição da hemaglutinação de amostra de soro de cerca de 30-40 gera  
5 proteção em torno de 50% da infecção por um vírus homólogo) [177]. As respostas de anticorpo são tipicamente medidas por inibição da hemaglutinação por by microneutralização, por imunodifusão radial única (SRID), e/ou por hemólise radial única (SRH). Essas técnicas de ensaio são bem  
10 conhecidas na técnica.

As composições da invenção podem ser administradas de vários modos. A via de imunização mais preferida é por injeção intramuscular (por exemplo, no braço ou perna), mas outras vias disponíveis incluem injeção subcutânea,  
15 intranasal [178-1 8 0], oral [181], intradérmica [182, 183], transcutânea, transdérmica [184] etc.

As vacinas da invenção podem ser usadas para tratar tanto crianças quanto adultos. As vacinas de influenza são atualmente recomendadas para uso em imunização pediátrica e  
20 de adultos, a partir dos 6 meses de idade. Assim, o paciente pode ter menos que 1 ano de idade, 1-5 anos de idade, 5-15 anos de idade, 15-55 anos de idade, ou pelo menos 55 anos de idade. Pacientes preferidos para receber as vacinas são os idosos (por exemplo, >50 anos de idade,  
25 >60 anos de idade, preferivelmente >65 anos de idade), os jovens (por exemplo, <5 anos de idade), pacientes hospitalizados, profissionais da área de saúde, do serviço militar e forças armadas, mulheres grávidas, os doentes crônicos, pacientes imunodeficientes, pacientes que  
30 receberam um composto antiviral (por exemplo, composto

oseltamivir ou zanamivir; veja abaixo) nos 7 dias antes de receber a vacina, pessoas com alergia a ovos e pessoas que viajam freqüentemente. Entretanto, as vacinas não adequadas apenas para esses grupos, e podem ser usadas mais  
5 geralmente na população. Para cepas pandêmicas, a administração a todos os grupos de idade é preferida.

As composições preferidas da invenção satisfazem 1, 2 ou 3 de critérios de CPMP para eficácia. Em adultos (18-60 anos), esses critérios são: (1)  $\geq 70\%$  de soroproteção; (2)  
10  $\geq 40\%$  de soroconversão; e/ou (3) um aumento de GMT  $\geq 2,5$  vezes. Em pacientes idosos ( $>60$  anos), esses critérios são: (1)  $\geq 60\%$  de soroproteção; (2)  $\geq 30\%$  de soroconversão; e/ou (3) um aumento de GMT  $\geq 2$  vezes. Esses critérios são baseados em estudos abertos com pelo menos 50 pacientes.

15 O tratamento é por um esquema de dose múltipla. Como mencionado acima, as várias doses usarão tipicamente a mesma forma de antígeno e partilham pelo menos um subtipo de hemaglutinina comum. É preferível que as doses sejam todas dadas por via parenteral ou todas dadas por via  
20 mucosa. As doses serão dadas tipicamente pela mesma via de administração, por exemplo, pela mesma via parenteral, como injeção i.m.

As doses múltiplas serão tipicamente administradas pelo menos com intervalo de 1 semana (por exemplo, pelo  
25 menos cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 6 semanas, cerca de 8 semanas, cerca de 10 semanas de intervalo, cerca de 12 semanas, cerca de 16 semanas de intervalo etc.).

Regimes de dosagem preferidos da invenção são regimes  
30 de 2 doses. Doses adicionais podem ser administradas em

estações de influenza subsequentes, tipicamente no formato usual de 1 dose, mas a imunização padrão em uma estação padrão (por exemplo, em um único período de 6 meses ou período de 12 meses) de acordo com a invenção envolverá 2  
5 doses. Doses extra no regime (por exemplo, um regime de 3 doses ou 4 doses) não são preferidos por causa da necessidade de antígeno extra. Se uma terceira dose for incluída no regime, no entanto, então a terceira dose pode ser uma repetição da primeira dose, seguida por uma dose  
10 adicional, ou ela pode ser uma repetição de uma dose adicional por exemplo, um regime 'com adjuvante, com adjuvante, sem adjuvante', ou um regime 'com adjuvante, sem adjuvante, sem adjuvante'.

As vacinas produzidas pela invenção podem ser  
15 administradas a pacientes ao mesmo tempo (por exemplo, durante a mesma consulta ao médico ou visita a um profissional de saúde ou centro de vacinação) que outras vacinas, por exemplo, ao mesmo tempo que a vacina de sarampo, vacina de caxumba, vacina de rubéola, vacina MMR,  
20 vacina de varicela, vacina de MMRV, vacina de difteria, vacina de tétano, vacina de pertussis, vacina DTP, vacina conjugada de *H. influenzae* tipo b, uma vacina de poliovírus inativada, uma vacina de vírus da hepatite B, um vacina meningocócica conjugada (como uma vacina tetravalente A-C-  
25 W135-Y), uma vacina de vírus sincicial respiratório, uma vacina conjugada pneumocócica etc. A administração ao mesmo tempo que uma vacina pneumocócica ou uma vacina meningocócica é particularmente útil em pacientes idosos.

De modo similar, as vacinas da invenção podem ser  
30 administradas a pacientes ao mesmo tempo que (por exemplo,

durante a mesma consulta ao médico ou visita a um profissional de saúde) um composto antiviral, e em particular um composto antiviral ativo contra vírus influenza (por exemplo, oseltamivir e/ou zanamivir). Esses antivirais incluem inibidores de neuraminidase, como um ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico ou ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enônico, incluindo ésteres desses (por exemplo, os ésteres etílicos) e sais desses (por exemplo, os sais de fosfato). Um antiviral preferido é ácido (3 R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster etílico, fosfato (1:1), também conhecido como fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™).

#### 15 Geral

O termo "que compreende" engloba "que inclui" bem como "que consiste em", por exemplo, uma composição "que compreende" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

20 A palavra "substancialmente" não exclui "completamente" por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Quando necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

25 O termo "cerca de" em relação a um valor numérico x significa, por exemplo,  $x \pm 10\%$ .

A menos que especificamente determinado, um processo que compreende uma etapa de mistura de dois ou mais componentes não requer qualquer ordem específica de  
30 mistura. Assim, os componentes podem ser misturados em

qualquer ordem. Quando há três componentes então dois componentes podem ser combinados um com o outro, e então a combinação pode ser combinada com o terceiro componente etc.

5 Quando materiais animais (e particularmente bovinos) são usados na cultura de células, eles devem ser obtidos de fontes que sejam livres de encefalopatia espongiforme transmissível (TSE), e em particular livre de encefalopatia espongiforme bovina (BSE). No geral, é preferível cultivar  
10 células na ausência total de materiais derivados de animais.

Quando um composto é administrado ao corpo como parte de uma composição então aquele composto pode ser alternativamente substituído por um pró-fármaco adequado.

15 Quando um substrato celular é usado para procedimentos de reclassificação ou de genética reversa, é preferível um que tenha sido aprovado para uso em produção de vacina humana, por exemplo, como em Ph Eur general capítulo 5.2.3.

**Breve descrição dos desenhos**

20 A Figura 1 mostra respostas de ELISA anti-HA IgG em camundongos que recebem várias vacinas de influenza.

#### **Modos de realizar a invenção**

Hemaglutinina foi preparada a partir de uma cepa H5N1 de influenza de ave e foi formulada para injeção  
25 intramuscular a 0,2 µg por dose (50 µl de volume per dose). Duas vacinas foram preparadas: a primeira sem adjuvante; a segunda com adjuvante com emulsão MF59 em uma proporção de volume de 1:1. As vacinas foram administradas a quatro grupos de fêmeas de camundongos Balb/c, de 8 semanas de  
30 idade, nos dias 0 e 28. foi feita retirada do sangue dos

camundongos nos dias 14 e 42 e as respostas imunes anti-HA foram avaliadas por ELISA.

Os resultados foram como se segue ( veja também a Figura 1):

| Grupo              | A             | B             | C             | D      |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|--------|
| Dia 0              | Sem adjuvante | MF59          | Sem adjuvante | MF59   |
| Dia 28             | Sem adjuvante | Sem adjuvante | MF59          | MF59   |
| Título<br>(Dia 14) | 13            | 313           | 6             | 271    |
| Que<br>respondem   | 3/10          | 10/10         | 3/10          | 10/10  |
| Título<br>(Dia 42) | 7125          | 75922         | 42219         | 148831 |
| Que<br>respondem   | 10/10         | 10/10         | 10/10         | 10/10  |

5 Portanto, o adjuvante aumenta significativamente o número daqueles que respondem após a primeira imunização (comparar grupos A e B). A inclusão de adjuvante em cada ou em ambas as doses gerou uma resposta de anticorpo anti-HA específica que é significativamente maior que aquela

10 induzida por duas doses de vacina sem adjuvante (comparar grupos B, C & D contra o grupo A). Além disso, os animais que receberam uma primeira vacina com adjuvante podem ser submetidos a um reforço com uma vacina sem adjuvante, atingindo títulos maiores que uma primeira vacina sem

15 adjuvante e um reforço com vacina com adjuvante (comparar grupos B & C). Embora esses títulos absolutos fossem menores no grupo B que no grupo D, a resposta foi mais que adequada. Assim estoques de um adjuvante podem ser mantidos pelo uso dele apenas na primeira dose em uma regime de 2

doses. Será compreendido que a invenção foi descrita por via de exemplo apenas e modificações podem ser feitas enquanto se permanece dentro do escopo e espírito da invenção.

5        **REFERÊNCIAS** (cujos conteúdos são aqui incorporados por referência)

- [1] Holmes e cols. (2005) *Science* 309:989.
- [2] Guy e cols. (1998) *Clin Diagn Lab Immunol* 5:732-6.
- [3] WO96/37624.
- 10 [4] WO98/46262.
- [5] WO95/18861.
- [6] WO02/28422.
- [7] WO02/067983.
- [8] WO02/074336.
- 15 [9] WO01/21151.
- [10] WO02/097072.
- [11] WO2005/113756.
- [12] Huckriede e cols. (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
- [13] Herlocher e cols. (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.
- 20 [14] Le e cols. (2005) *Nature* 437(7062):1108.
- [15] World Health Organisation (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21.
- [16] Hoffmann e cols. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
- [17] Subbarao e cols. (2003) *Virology* 305:192-200.
- 25 [18] Liu e cols. (2003) *Virology* 314:580-590.
- [19] Ozaki e cols. (2004) *J. ViroL* 78:1851-1857.
- [20] Webby e cols. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
- [21] WO00/60050.
- [22] WO01/04333.
- 30 [23] US 6649372.

- [24] Neumann e cols. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.
- [25] WO2006/067211.
- [26] WO01/83794.
- 5 [27] Hoffmann e cols. (2000) *Virology* 267(2):310-7.
- [28] WO97/37000.
- [29] Brands e cols. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [30] Halperin e cols. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [31] Tree e cols. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- 10 [32] Kistner e cols. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [33] Kistner e cols. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [34] Bruhl e cols. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [35] Pau e cols. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [36] <http://www.atcc.org/>
- 15 [37] <http://locus.umd.edu/>
- [38] WO03/076601.
- [39] WO2005/042728.
- [40] WO03/043415.
- [41] WO01/85938.
- 20 [42] WO2006/108846.
- [43] EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [44] WO2006/071563.
- [45] WO2005/113758.
- [46] WO2006/027698.
- 25 [47] WO97/37000
- [48] WO03/023021
- [49] WO03/023025
- [50] WO97/37001.
- [51] WO01/22992.
- 30 [52] Hehme e cols. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.

- [53] Treanor e cols. (1996) 3. *Infect Dis* 173:1467-70.
- [54] Keitel e cols. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
- [55] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.
- 5 [56] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.
- 10 [57] Ji e cols. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [58] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol* 45:7-12.
- [59] Lahijani e cols. (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80.
- [60] Lokteff e cols. (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
- [61] EP-B-0870508.
- 15 [62] US 5948410.
- [63] WO2007/052163.
- [64] patente US 6.355.271.
- [65] WO00/23105.
- [66] US 4.680.338.
- 20 [67] US 4.988.815.
- [68] WO92/15582.
- [69] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [70] Wu e cols. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [71] Vasilakos e cols. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
- 25 [72] patentes US 4.689.338, 4.929.624, 5.238.944, 5.266.575, 5.268.376, 5.346.905, 5.352.784, 5.389.640, 5.395.937, 5.482.936, 5.494.916, 5.525.612, 6.083.505, 6.440.992, 6.627.640, 6.656.938, 6.660.735, 6.660.747, 6.664.260, 6.664.264, 6.664.265,
- 30 6.667.312, 6.670.372, 6.677.347, 6.677.348,

6.677.349, 6.683.088, 6.703.402, 6.743.920,  
6.800.624, 6.809.203, 6.888.000 e 6.924.293.

[73] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.

[74] WO2004/060308.

5 [75] US 6.924.271.

[76] US2005/0070556.

[77] US 5.658.731.

[78] WO2004/064759.

[79] US patent 5,011,828.

10 [80] WO2004/87153.

[81] US 6.605.617.

[82] WO02/18383.

[83] WO2004/018455.

[84] WO03/082272.

15 [85] WO2006/002422.

[86] Johnson e cols. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

[87] Evans e cols. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.

[88] Andrianov e cols. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.

20 [89] Payne e cols. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.

[90] US 5.057.540.

[91] WO96/33739.

[92] EP-A-0109942.

25 [93] WO96/11711.

[94] WO00/07621.

[95] Barr e cols. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.

[96] Sjolanderet e cols. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.

30

- [97] Pizza e cols. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [98] WO95/17211.
- [99] WO98/42375.
- [100] Singh e cols. (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- 5 [101] WO99/27960.
- [102] US 6.090.406
- [103] US 5.916.588
- [104] EP-A-0626169.
- [105] WO99/52549.
- 10 [106] WO01/21207.
- [107] WO01/21152.
- [108] WO02/072012.
- [109] Dyakonova e cols. (2004) *Int Immunopharmacol*  
4(13):1615-23.
- 15 [110] FR-2859633.
- [111] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol*  
3(8):1177-86.
- [112] WO2004/064715.
- [113] De Libero e cols, *Nature Reviews Immunology*,  
20 2005, 5: 485-496
- [114] patente US 5.936.076.
- [115] Oki e cols., *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640
- [116] US2005/0192248
- [117] Yang e cols., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43:  
25 3818-3822
- [118] WO2005/102049
- [119] Goff e cols., *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126:  
13602-13603
- [120] WO03/105769
- 30 [121] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.

- [122] WO03/011223.
- [123] Meraldi e cols. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [124] Pajak e cols. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [125] US-6.586.409.
- 5 [126] Wong e cols. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [127] US2005/0215517.
- [128] WO90/14837.
- [129] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines*
- 10 2:197-203.
- [130] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [131] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 15 [132] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [133] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [134] Hariharan e cols. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- 20 [135] US-2007/014805.
- [136] WO95/11700.
- [137] patente US 6.080.725.
- [138] WO2005/097181.
- [139] WO2006/113373.
- 25 [140] Han e cols. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.*
- [141] US- 6.630.161.
- 30 [142] Kandimalla e cols. (2003) *Nucleic Acids Research*

31:2.393-2.400.

[143] WO02/26757.

[144] WO99/62923.

[145] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.

5 [146] McCluskie e cols. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.

[147] WO98/40100.

[148] patente US 6.207.646.

[149] patente US 6.239.116.

10 [150] patente US 6.429.199.

[151] Kandimalla e cols. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658.

[152] Blackwell e cols. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.

[153] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.

15 [154] WO01/95935.

[155] Kandimalla e cols. (2003) *BBRC* 306:948-953.

[156] Bhagat e cols. (2003) *BBRC* 300:853-861.

[157] WO03/035836.

[158] WO01/22972.

20 [159] Thompson e cols. (2005) *J Leucoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T células'.

[160] Pedido de patente UK GB-A-2220211.

[161] WO 94/21292.

25 [162] WO94/00153.

[163] WO95/17210.

[164] WO96/26741.

[165] WO93/19780.

[166] Gennaro (2000) *Remington: The Science and*

30 *Practice of Pharmacy*. 20ª edição, ISBN: 0683306472.

- [167] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
- [168] Nony e cols. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [169] WO2005/089837.
- [170] Patente US 6.692.468.
- 5 [171] WO00/07647.
- [172] WO99/17820.
- [173] Patente US 5.971.953.
- [174] Patente US 4.060.082.
- [175] EP-A-0520618.
- 10 [176] WO98/01174.
- [177] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.
- [178] Greenbaum e cols. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
- [179] Zurbriggen e cols. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
- 15 [180] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc* (Wash DC). 43:728-30.
- [181] Mann e cols. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
- [182] Halperin e cols. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
- 20 [183] Herbert e cols. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
- [184] Chen e cols. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.



PI0713150-0

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para a imunização de um paciente contra infecção por vírus influenza, caracterizado por compreender as etapas de:

5        (i) administração de uma dose de vacina de vírus influenza em combinação com um primeiro adjuvante; e

          (ii) administração de uma dose adicional de vacina de vírus influenza sem aquele adjuvante.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, 10 caracterizado pelo fato de que a dose adicional é administrada pela mesma via que a primeira dose.

3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a dose adicional não contém adjuvante.

15        4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a dose adicional contém um adjuvante que é diferente do primeiro adjuvante.

20        5. Kit caracterizado por compreender: (i) uma primeira vacina de vírus influenza em combinação com um primeiro adjuvante; e (ii) uma segunda vacina de vírus influenza sem aquele adjuvante.

6. Uso de (i) uma primeira vacina de vírus influenza em combinação com um primeiro adjuvante; e (ii) uma segunda 25 vacina de vírus influenza sem aquele adjuvante, caracterizado por ser para a manufatura de uma vacina de influenza de multidoses.

7. Método para completar a imunização de um paciente contra infecção por vírus influenza, em que o paciente 30 recebeu previamente uma dose de vacina de vírus influenza

em combinação com um primeiro adjuvante, e o método caracterizado por compreender a etapa de administração àquele paciente de uma dose adicional de vacina de vírus influenza sem aquele adjuvante.

5           8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a dose adicional é administrada pela mesma via que a dose prévia.

          9. Uso de uma vacina de vírus influenza sem adjuvante caracterizado por ser para a manufatura de um  
10 medicamento para imunização de um paciente contra infecção por vírus influenza, em que aquele paciente recebeu previamente uma vacina de vírus influenza com adjuvante.

          10. Uso de um segundo adjuvante de vacina de vírus influenza caracterizado por ser para a manufatura de um  
15 medicamento para imunização de um paciente contra infecção por vírus influenza, em que aquele paciente recebeu previamente uma vacina de vírus influenza com adjuvante, em que os adjuvantes no primeiro e segundo vírus influenza não são o mesmo.

20           11. Método, kit ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que as vacinas incluem hemaglutinina em menos que 15 µg por cepa por vacina.

          12. Método, kit ou uso, de acordo com qualquer uma  
25 das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que a vacina de vírus influenzas inclui um antígeno de vírus influenza de um subtipo H1, H2, H3, H5, H7 ou H9 de vírus influenza A.

          13. Método, kit ou uso, de acordo com qualquer uma das  
30 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12,

caracterizado pelo fato de que o primeiro adjuvante compreende uma emulsão óleo-em-água.

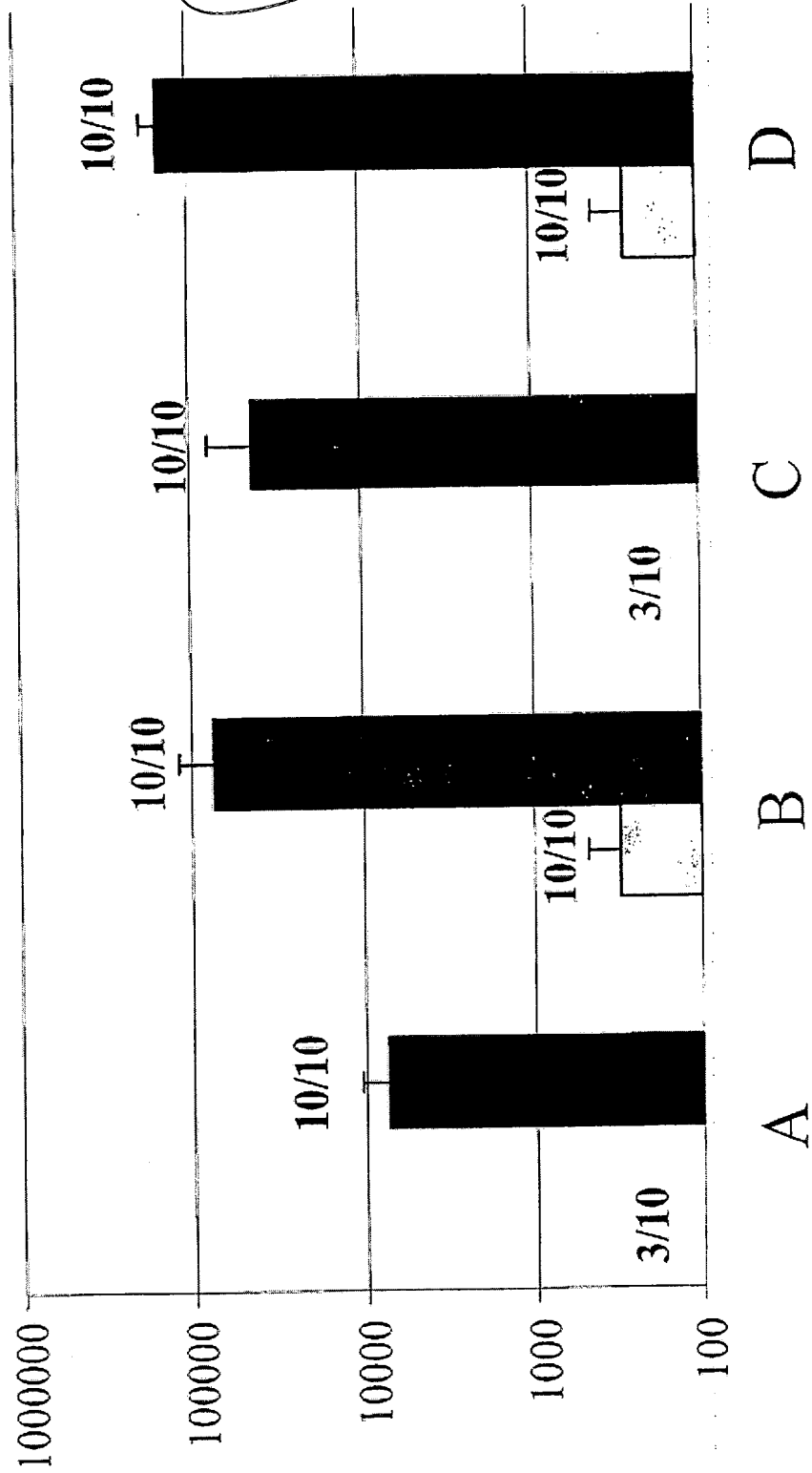


Figura 1

**REGIME EM MULTIDOSES DE VACINAÇÃO DE INFLUENZA POUPADOR DE  
ADJUVANTE**

Uma vacina de influenza é administrada por um regime de multidoses, em que (i) uma primeira dose é administrada com um adjuvante e (ii) uma dose posterior é administrada sem um adjuvante ou com um adjuvante diferente. Portanto, a invenção fornece o benefício de um regime de duas doses sem também duplicar a necessidade de suprimento por um dado adjuvante.