



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

(11) PI 0210076-2 B1



(22) Data do Depósito: 29/05/2002

(45) Data de Concessão: 07/01/2020

(54) Título: PREPARAÇÃO DE VÍRUS DA INFLUENZA INATIVADO, VACINA DE INFLUENZA, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UM ANTÍGENO DE HEMAGLUTININA ESTÁVEL, E, USO DE ALFA-TOCOFEROL OU SUCCINATO

(51) Int.Cl.: C12N 7/04; A61K 39/145; A61P 31/16.

(30) Prioridade Unionista: 21/02/2002 GB 0204116.8; 30/05/2001 GB 0113083.0.

(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS BRANCH OF SMITHKLINE BEECHAM PHARMA GMBH & CO KG.

(72) Inventor(es): UWE EICHHORN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2002005883 de 29/05/2002

(87) Publicação PCT: WO 2002/097072 de 05/12/2002

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/11/2003

(57) Resumo: "PREPARAÇÃO DE VÍRUS DA INFLUENZA INATIVADO, VACINA DE INFLUENZA, MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE UM ANTÍGENO DE HEMAGLUTININA ESTÁVEL E PARA A PROFILAXIA DA DOENÇA OU INFECÇÃO DE INFLUENZA EM UM INDIVÍDUO, E, USO DE ALFA-TOCOFEROL OU DE UM SEU DERIVADO". Uma preparação de vírus da influenza inativado é descrita a qual compreende um antígeno de hemaglutinina estabilizado na ausência de tiomersal, ou em níveis baixos de tiomersal, na qual a hemaglutinina é detectável por um ensaio de SRD. A preparação de vírus da influenza pode compreender um excipiente modificador de micela, por exemplo 244>-tocoferol ou um seu derivado em uma quantidade suficiente para estabilizar a hemaglutinina.

“PREPARAÇÃO DE VÍRUS DA INFLUENZA INATIVADO, VACINA DE INFLUENZA, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UM ANTÍGENO DE HEMAGLUTININA ESTÁVEL, E, USO DE ALFA-TOCOFEROL OU SUCCINATO”

5 Esta invenção refere-se às novas preparações de antígeno de vírus da influenza, aos métodos para a preparação delas e ao uso das mesmas em profilaxia ou terapia. Em particular a invenção refere-se às vacinas de influenza inativadas que estão desintegradas em vez das vacinas de vírus integral e que são estáveis na ausência de conservantes organomercuriais. Em
10 adição, as vacinas contêm hemaglutinina que é estável de acordo com os testes padrão. As vacinas podem ser administradas por qualquer rota adequada para tais vacinas, tais como intramuscular, subcutânea, intradermal ou mucosamente por exemplo intranasalmente.

 O vírus da influenza é um dos vírus mais ubíquos presentes no
15 mundo, afetando tanto humanos como animais domésticos. O impacto econômico da influenza é significativo.

 O vírus da influenza é um vírus de RNA envelopado com um tamanho de partícula de cerca de 125 nm em diâmetro. Ele consiste basicamente de um nucleocapsídeo interno ou núcleo de ácido ribonucleico
20 (RNA) associado com nucleoproteína, circundado por um envelope viral com uma estrutura de bicamada lipídica e glicoproteínas externas. A camada interna do envelope viral é composta predominantemente de proteínas de matriz e a camada externa principalmente de material lipídico derivado do hospedeiro. As glicoproteínas de superfície neuraminidase (NA) e
25 hemaglutinina (HA) aparecem como espigões, de comprimento de 10 nm a 12 nm, na superfície das partículas. São estas proteínas de superfície, particularmente a hemaglutinina, que determinam a especificidade antigênica dos subtipos de influenza.

As vacinas de influenza atualmente disponíveis são vacinas de influenza quer inativadas quer vivas atenuadas. As vacinas de flu inativadas são compostas de três formas possíveis de preparação de antígeno: vírus inteiro inativado, sub-vírions nos quais partículas de vírus purificadas são desintegradas com detergentes ou outros reagentes para a solubilização do envelope lipídico (a denominada vacina “dividida”) ou NA e HA purificadas (vacina de subunidade). Estas vacinas inativadas são dadas intramuscularmente (i.m.) ou intranasalmente (i.n.). Não há vacina viva atenuada comercialmente disponível.

As vacinas de influenza, de todos os tipos, são normalmente vacinas trivalentes. Em geral contêm antígenos derivados de duas cepas de vírus da influenza A e uma cepa de vírus da influenza B. Uma dose injetável de 0,5 mL padrão na maioria dos casos contém 15 µg de componente antígeno de hemaglutinina de cada cepa, medido por imunodifusão radial simples (SRD) (J. M. Wood *et al.*: “An improved single radialimmunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines”. *J. Biol. Stand.* 5 (1977) 237-247; J. M. Wood *et al.*, “International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus”. *J. Biol. Stand.* 9 (1981) 317-330).

As cepas de vírus da influenza a serem incorporadas a cada estação de vacina de influenza são determinadas pela World Health Organisation em colaboração com as autoridades nacionais da saúde e os fabricantes de vacina.

Típicas epidemias de influenza causam aumentos em incidência de pneumonia e doença respiratória inferior confirmados por taxas aumentadas de hospitalização ou mortalidade. Os idosos ou aqueles com doenças crônicas subjacentes são os mais propensos a experimentarem tais

complicações, mas crianças também podem sofrer de doença grave. Estes grupos em particular necessitam ser portanto protegidos.

Esforços correntes para o controle da morbidade e da mortalidade associadas com epidemias de influenza anuais baseiam-se no uso de vacinas de influenza inativadas administradas intramuscularmente. A eficácia de tais vacinas na prevenção de doença respiratória e das complicações de influenza varia de 75% em adultos saudáveis a menos do que 50% em idosos.

Padrões são aplicados internacionalmente para a medição da eficácia das vacinas de influenza. Os critérios oficiais da União Européia para uma vacina efetiva contra a influenza são descritos na tabela abaixo. Teoricamente, para se atenderem os requerimentos da União Européia, uma vacina de influenza tem que atender apenas a um dos critérios na tabela, para todas as cepas de influenza incluídas na vacina. Contudo na prática, pelo menos dois ou todos os três critérios necessitarão ser atendidos para todas as cepas, particularmente para uma vacina nova tal como a vacina nova para liberação via uma rota diferente. Sob algumas circunstâncias dois critérios podem ser suficientes. Por exemplo, pode ser aceitável que dois dos três critérios sejam atendidos por todas as cepas enquanto que o terceiro critério seja atendido por algumas mas não todas as cepas (por exemplo duas de três cepas). Os requerimentos são diferentes para populações de adultos (18-60 anos) e para populações de idosos (> 60 anos).

	18-60 anos	> 60 anos
Taxa de soroconversão*	> 40%	> 30%
Fator de conversão**	> 2,5	> 2,0
Taxa de proteção***	> 70%	> 60%

* Taxa de soroconversão é definida como a percentagem de vacinados que possuem pelo menos um aumento de 4 vezes nos títulos de inibição de hemaglutinina (HI) sérica após a vacinação, para cada cepa de vacina.

** Fator de conversão é definido como o aumento de vezes nos títulos médios geométricos (GMTs) de HI sérica após a vacinação, para cada cepa de vacina.

*** Taxa de proteção é definida como a percentagem de vacinados com um título de HI sérica igual ou maior do que 1:40 após a vacinação (para cada cepa de vacina) e é normalmente aceito como indicação de proteção.

Para que uma vacina de flu nova seja comercialmente útil ela não apenas necessitará atender àqueles padrões, mas também na prática ela necessitará ser pelo menos tão eficaz quanto as vacinas injetáveis atualmente disponíveis. Ela também necessitará ser comercialmente viável em termos de

5 quantidade de antígeno e de número de administrações requeridas.

As vacinas de influenza atuais comercialmente disponíveis são vacinas injetáveis quer dividida quer de subunidade. Estas vacinas são preparadas pela degradação da partícula viral, em geral com um solvente orgânico ou detergente, e pela separação ou purificação das proteínas virais

10 em extensões variadas. As vacinas divididas são preparadas pela fragmentação do vírus da influenza inteiro, quer infeccioso quer inativado, com concentrações solubilizantes de solventes orgânicos ou detergentes e a subsequente remoção do agente solubilizante e de um pouco ou da maior parte do material lipídico de matriz. As vacinas divididas em geral contêm

15 nucleoproteína e proteína de matriz e algumas vezes lipídeo, bem como as proteínas de envelope de membrana. As vacinas divididas normalmente conterão a maior parte das ou todas as proteínas estruturais do vírus embora não necessariamente nas mesmas proporções que ocorrem no vírus inteiro. As vacinas de subunidade por outro lado consistem essencialmente de proteínas

20 de superfície viral elevadamente purificadas, hemaglutinina e neuraminidase, que são proteínas de superfície responsáveis pela geração de anticorpos neutralizadores do vírus desejados durante a vacinação.

Muitas vacinas que estão atualmente disponíveis requerem um conservante para se evitar a deterioração. Um conservante freqüentemente

25 usado é tiomersal que é um composto contendo mercúrio. Algumas preocupações do público têm sido expressadas sobre os efeitos dos compostos contendo mercúrio. Não há sistema de vigilância apropriado para se detectarem os efeitos de doses baixas a moderadas de compostos orgânicos de mercúrio sobre o sistema nervoso em desenvolvimento, e estudos especiais de

crianças que têm recebido doses altas de compostos orgânicos de mercúrio levarão vários anos para se completarem. Certos comentadores têm enfatizado que os perigos potenciais de vacinas contendo tiomersal não devem ser exagerados (Offit; P. A. JAMA Vol. 283; No. 16). Contudo, seria vantajoso que se encontrassem métodos alternativos para a preparação de vacinas para substituir o uso de tiomersal no processo de fabricação. Portanto há uma necessidade de desenvolvimento de vacinas que estejam livres de tiomersal, em particular de vacinas como as vacinas de influenza que são recomendadas, pelo menos para certos grupos de população, em uma base anual.

Até o presente tem sido prática padrão o emprego de um conservante para vacinas de influenza inativadas comerciais, durante o processo de produção/purificação e/ou na vacina final. O conservante é requerido para se evitar o crescimento de microorganismos no decorrer dos vários estágios de purificação. Para as vacinas de influenza derivadas de ovo, o tiomersal é tipicamente adicionado no fluido alantóico cru e também pode ser adicionado uma segunda vez durante o processamento do vírus. Assim haverá tiomersal residual presente no final do processo, e este pode ser adicionalmente ajustado para uma concentração de conservante desejável na vacina final, por exemplo para uma concentração ao redor de 100 µg/mL.

Um efeito colateral do emprego de tiomersal como um conservante em vacinas de flu é um efeito de estabilização. O tiomersal em vacinas de flu comerciais atua para estabilizar o componente HA da vacina, em particular mas não exclusivamente HA da influenza de cepa B. Certas hemaglutininas de cepa A por exemplo H3 também podem requerer estabilização. Portanto, embora possa ser desejável considerar a remoção do tiomersal das vacinas de influenza, ou pelo menos a redução da concentração de tiomersal na vacina final, há um problema a ser suplantado pelo fato de que, sem tiomersal, a HA não mais estará suficientemente estável.

Tem sido descoberto na presente invenção que é possível

estabilizar HA em preparações de influenza inativada usando-se reagentes alternativos que não contêm compostos orgânicos de mercúrio. A HA permanece estabilizada de tal modo que ela é detectável no decorrer do tempo por métodos padrão quantitativos, em particular SRD, em uma extensão maior do que a de uma preparação de antígeno não-estabilizada produzida pelo mesmo método mas sem o excipiente estabilizador. O método de SRD é realizado como descrito aqui acima. O importante é que a HA permaneça estabilizada por até 12 meses que é o padrão requerido para uma vacina de flu final.

Em um primeiro aspecto a presente invenção proporciona uma preparação de vírus da influenza inativado compreendendo um antígeno de hemaglutinina estabilizado na ausência de tiomersal, ou em níveis baixos de tiomersal, na qual a hemaglutinina é detectável por um ensaio de SRD.

Níveis baixos de tiomersal são aqueles níveis nos quais a estabilidade de HA derivada de influenza B é reduzida, de tal modo que um excipiente estabilizador é requerido para HA estabilizada. Os níveis baixos de tiomersal são em geral de 5 µg/mL ou menores.

Em geral, HA estabilizada refere-se à HA que é detectável no decorrer do tempo por métodos padrão quantitativos, em particular SRD, em uma extensão maior do que a de uma preparação de antígeno não estabilizada produzida pelo mesmo método mas sem qualquer excipiente estabilizador. A estabilização da HA preferivelmente mantém a atividade de HA substancialmente constante durante um período de um ano. Preferivelmente, a estabilização permite que a vacina compreendendo HA proporcione proteção aceitável após um período de armazenagem de 6 meses, com maior preferência um período de um ano.

Adequadamente, a estabilização é realizada por um excipiente estabilizador, preferivelmente um excipiente modificador de micela. Um excipiente modificador de micela é em geral um excipiente que pode ser

incorporado em uma micela formada pelos detergentes usados na, ou adequados para a, solubilização da proteína de membrana HA, tais como os detergentes Tween 80, Triton X 100 e desoxicolato, individualmente ou em combinação.

5 Sem o desejo se ficar restringido por teoria, acredita-se que os excipientes funcionam para estabilizarem a HA por interação com os lipídeos, detergentes e/ou proteínas na preparação final. As micelas mistas de excipiente com proteína e lipídeo podem ser formadas, tais como as micelas de Tween e desoxicolato com lipídeos residuais e/ou Triton X-100. É
10 considerado que as proteínas de superfície são mantidas solubilizadas por aquelas micelas complexas. Preferivelmente, a agregação de proteína é limitada pela repulsão de carga de micelas contendo excipientes adequados, tais como as micelas contendo detergentes negativamente carregados.

Os excipientes modificadores de micela apropriados incluem:
15 moléculas anfífilas positiva, negativa ou zwitterionicamente carregadas tais como alquil-sulfatos, ou alquil-aril-sulfatos; moléculas anfífilas não-iônicas tais como alquil-poliglicosídeos ou seus derivados, tal como Plantacare® (disponível na Henkel KGaA), ou alquil-álcool-polialquilenos-éteres ou seus derivados tal como Laureth-9.

20 Os excipientes preferidos são α -tocoferol, ou derivados de α -tocoferol tal como succinato de α -tocoferol. Outros derivados de tocoferol preferidos para uso na invenção incluem D- α -tocoferol, D- δ -tocoferol, D- γ -tocoferol e DL- α -tocoferol. Derivados de tocoferóis preferidos que podem ser utilizados incluem acetatos, succinatos, ésteres de ácido fosfórico, formiatos,
25 propionatos, butiratos, sulfatos e gliconatos. Succinato de alfa-tocoferol é particularmente preferido. O α -tocoferol ou derivado está presente em uma quantidade suficiente para estabilizar a hemaglutinina.

Outros excipientes adequados podem ser identificados por métodos padrão na arte, e testados por exemplo usando-se o método de SRD

para a análise de estabilidade como aqui descrita.

Em um aspecto preferido a invenção proporciona uma preparação de antígeno de vírus da influenza compreendendo pelo menos um antígeno de hemaglutinina de cepa B de influenza estável.

5 A invenção proporciona em um outro aspecto um método para a preparação de um antígeno de hemaglutinina estável cujo método compreende a purificação do antígeno na presença de um excipiente modificador de micela estabilizador, preferivelmente α -tocoferol ou um seu derivado tal como succinato de α -tocoferol.

10 São adicionalmente proporcionadas pela invenção vacinas compreendendo as preparações de antígeno aqui descritas e seu uso em um método para a profilaxia de infecção ou doença de influenza em um indivíduo cujo método compreende a administração ao indivíduo de uma vacina de acordo com a invenção.

15 A vacina pode ser administrada por qualquer rota de liberação adequada, tal como intradermal, mucosal por exemplo intranasal, oral, intramuscular ou subcutânea. Outras rotas de liberação são bem conhecidas na arte.

20 A liberação intradermal é preferida. Qualquer dispositivo adequado pode ser usado para a liberação intradermal, por exemplo dispositivos de agulha curta tais como aqueles descritos em US 5.190.521, US 5.328.483, US 5.527.288, US 4.270.537, US 5.015.235, US 5.141.496, US 5.417.662. Vacinas intradermais também podem ser administradas por dispositivos que limitam o comprimento de penetração efetiva de uma agulha na pele, tais como aqueles descritos em WO 99/34850 e EP 1092444, aqui incorporados como referência, e seus equivalentes funcionais. Também são adequados os dispositivos de injeção de jato que liberam vacinas líquidas na derme via um injetor de jato de líquido ou via uma agulha que perfura a stratum corneum e produz um jato que alcança a derme. Dispositivos de

25

injeção de jato são descritos por exemplo em US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520. 639, US 4.596.556US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 e em WO 97/13537. Também são apropriados os dispositivos de liberação de partícula/pó balísticos que usam gás comprimido para acelerar a vacina na forma de pó através das camadas externas da pele para a derme. Adicionalmente, seringas convencionais podem ser empregadas no método de Mantoux clássico de administração intradermal. Contudo, o uso de seringas convencionais requer operadores altamente experientes e portanto são preferidos os dispositivos que são capazes de liberação acurada sem um usuário elevadamente experiente.

A invenção portanto proporciona um método para a profilaxia de doença ou infecção de influenza em um indivíduo cujo método compreende a administração intradermal ao indivíduo de uma vírus da influenza de acordo com a invenção.

A invenção também se refere aos dispositivos intradermais em combinação com uma vacina de acordo com a presente invenção, em particular com dispositivos descritos em WO99/34850 ou EP1092444, por exemplo.

Também é proporcionado o uso de um excipiente modificador de micela, preferivelmente α -tocoferol ou um seu derivado como um estabilizador de hemaglutinina na manufatura de uma vírus da influenza.

A invenção aplica-se particularmente mas não exclusivamente à estabilização de cepa B de hemaglutinina de influenza.

Preferivelmente a HA estabilizada da presente invenção é estável por 6 meses, com maior preferência por 12 meses.

Preferivelmente o α -tocoferol está na forma de um éster, com maior preferência de succinato ou de acetato e mais preferivelmente de

succinato.

Concentrações preferidas de α -tocoferol ou de derivado estão entre 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 mg/mL , com maior preferência entre 10 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$.

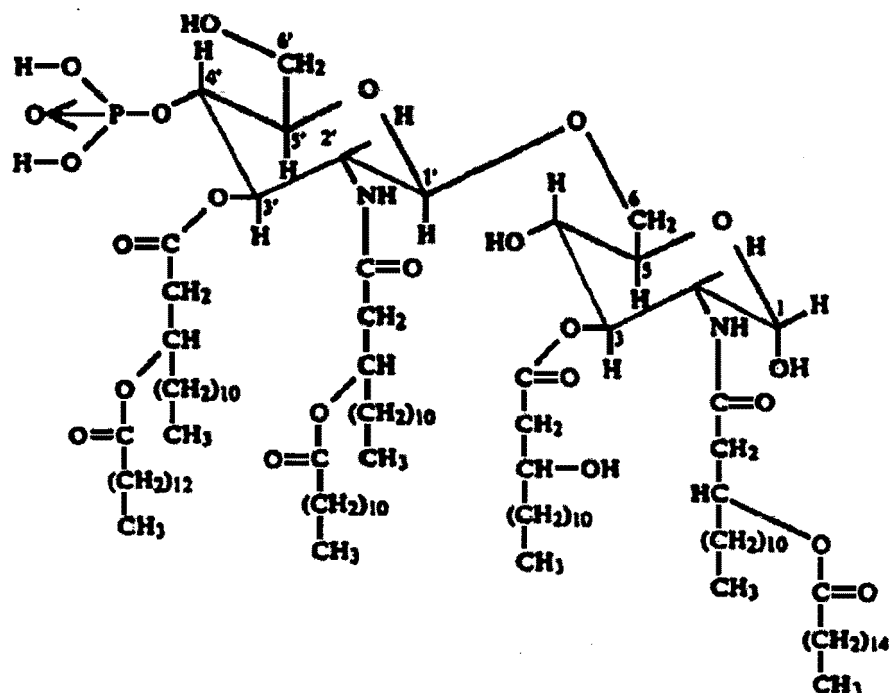
5 A vacina de acordo com a invenção em geral contém ambos os antígenos de vírus de cepas A e B, tipicamente em uma composição trivalente de duas cepas A e uma cepa B. Contudo, vacinas divalentes e monovalentes não estão excluídas. Vacinas monovalentes podem ser vantajosas em uma situação pandêmica, por exemplo, onde for importante a obtenção mais rápida possível de vacina produzida e administrada.

10 A preparação de antígeno de flu não-viva para uso na invenção pode ser selecionada do grupo consistindo de preparações de antígeno de vírus dividido, antígenos de subunidade (quer recombinantemente expressados quer preparados de vírus inteiro), de vírus inteiro inativado que
15 podem ser quimicamente inativados com por exemplo formaldeído, β -propiolactona ou diferentemente inativados por exemplo com U.V. ou com calor. Preferivelmente a preparação de antígeno é quer uma preparação de vírus dividido, quer um antígeno de subunidade preparado de vírus inteiro, particularmente pode um processo de divisão seguido por purificação do
20 antígeno de superfície. Mais preferidas são as preparações de vírus dividido.

Preferivelmente a concentração de antígeno de hemaglutinina para a ou cada cepa de preparação de vírus da influenza é de 1-1.000 $\mu\text{g/mL}$, com maior preferência de 3-300 $\mu\text{g/mL}$ e mais preferivelmente de cerca de 30 $\mu\text{g/mL}$, medida por um ensaio de SRD.

25 A vacina de acordo com a invenção pode compreender adicionalmente um adjuvante ou imunoestimulante tal como mas não limitado a lipídeo A destoxificado de qualquer fonte e derivados de lipídeo A atóxicos, saponinas e outros reagentes capazes de estimularem uma resposta de tipo TH1.

É sabido há longo tempo que lipossacarídeo enterobacteriano (LPS) é um estimulante potente do sistema imune, embora seu uso em adjuvantes tenha sido restringido por seus efeitos tóxicos. Um derivado de LPS atóxico, monofosforil-lipídeo A (MPL) produzido pela remoção do grupo carboidrato central e o fosfato da glicosamina de extremidade redutora, tem sido descrito por Ribi *et al.* (1986, "Immunology and immunopharmacology of bacterial endotoxins", Plenum Publ. Corp., NY, p407-419) e possui a seguinte estrutura:



Uma outra versão destoxificada de MPL resulta da remoção da cadeia acila da posição 3 da estrutura base de dissacarídeo, e é chamada de monofosforil-lipídeo A 3-O-desacilado (3D-MPL). Pode ser purificada e preparada por métodos ensinados em GB 2122204B, cuja referência também descreve a preparação de difosforil-lipídeo A, e suas variantes 3-O-desaciladas.

Uma forma preferida de 3D-MPL é a forma de uma emulsão possuindo um tamanho de partícula pequeno menor do que 0,2 μm em diâmetro, e seu método de manufatura é descrito em WO 94/21292. Formulações aquosas compreendendo monofosforil-lipídeo A e um tensoativo

têm sido descritas em WO9843670A2.

Os adjuvantes derivados de lipopolissacarídeo bacteriano a serem formulados nas composições da presente invenção podem ser purificados e processados de fontes bacterianas, ou alternativamente podem ser sintéticos. Por exemplo, monofosforil-lipídeo A purificado é descrito em Ribi *et al.* 1986 (*supra*), e monofosforil- ou difosforil-lipídeo A 3-O-desacilado derivado de *Salmonella* sp. é descrito em GB 2220211 e US 4912094. Outros lipopolissacarídeos sintéticos e purificados têm sido descritos (Hilgers *et al.*, 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79 (4): 392-6; Hilgers *et al.*, 1987, *Immunology*, 60(1): 141-6; e EP 0.549.074B1). Um adjuvante de lipopolissacarídeo bacteriano particularmente preferido é 3D-MPL.

Conseqüentemente, os derivados de LPS que podem ser usados na presente invenção são aqueles imunoestimulantes que são semelhantes em estrutura àquela de LPS ou MPL ou 3D-MPL. Em outro aspecto da presente invenção os derivados de LPS podem ser um monossacarídeo acilado, que é uma subporção da estrutura de MPL acima.

As saponinas são ensinadas em: Lacaille-Dubois, M. e Wagner H. (1996. "A review of the biological and pharmacological activities of saponins". *Phytomedicine* vol. 2 pp 363-386). As saponinas são glicosídeos triterpênicos ou esteroidais amplamente distribuídos nos reinos vegetal e animal marino. Observa-se que as saponinas formam soluções coloidais em água que espumam quando agitadas, e precipitam colesterol. Quando as saponinas estão próximas de membranas celulares elas formam estruturas porosas na membrana que causam a ruptura da membrana. Hemólise de eritrócitos é um exemplo deste fenômeno, que é uma propriedade de certas, mas não de todas as, saponinas.

As saponinas são conhecidas como adjuvantes em vacinas para administração sistêmica. A atividade hemolítica e adjuvante das saponinas

individuais tem sido extensivamente estudada na arte (Lacaille-Dubois e Wagner, *supra*). Por exemplo Quil A (derivada da casca de árvore sul-americana *Quillaja Saponaria Molina*), e suas frações, são descritas em US 5.057.540 e "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1996,12 (1-2):1-55 ; e EP 0362.279 B1. Estruturas particuladas, chamadas de complexos estimulantes imunes (ISCOMS), compreendendo frações de Quil A são hemolíticas e têm sido usadas na fabricação de vacinas (Morein, B., EP 0.109.942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). As saponinas hemolíticas QS21 e QS17 (frações de Quil A purificadas por HPLC) têm sido descritas como adjuvantes sistêmicos potentes, e o método de sua produção é descrito na Patente U.S. 5.057.540 e em EP 0.362.279 B1. Outras saponinas que têm sido usadas em estudos de vacinação sistêmica incluem aquelas derivadas de outras espécies de planta tais como *Gypsophila* e *Saponaria* (Bomford *et al.*, *Vaccine*, 10 (9): 572-577,1992).

Um sistema melhorado envolve a combinação de um derivado de lipídeo A atóxico e um derivado de saponina particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL como descrita em WO 94/00153, ou uma composição menos reatogênica na qual a QS21 está extinta com colesterol como descrita em WO 96/33739.

Uma formulação de adjuvante particularmente potente envolvendo QS21 e 3D-MPL em uma emulsão de óleo-em-água é descrita em WO 95/17210 e é uma formulação preferida.

Conseqüentemente em uma modalidade da presente invenção é proporcionada uma vacina compreendendo uma preparação de antígeno de influenza da presente invenção contendo como adjuvante lipídeo A destoxificado ou um derivado de lipídeo A atóxico, mais preferivelmente contendo como adjuvante um monofosforil-lipídeo A ou seu derivado.

Preferivelmente a vacina compreende adicionalmente uma

saponina, com maior preferência QS21.

Preferivelmente a formulação compreende adicionalmente uma emulsão de óleo-em-água. A presente invenção também proporciona um método para a produção de uma formulação de vacina compreendendo a
5 misturação de uma preparação de antígeno da presente invenção juntamente com um excipiente farmacêuticamente aceitável, tal como 3D-MPL.

As vacinas de acordo com a invenção podem compreender adicionalmente pelo menos um tensoativo que pode ser em particular um tensoativo não-iônico. Os tensoativos não-iônicos adequados são selecionados
10 do grupo consistindo de octil- ou nonil-fenóxi-polioxietanóis (por exemplo a série Triton[®] comercialmente disponível), ésteres de polioxietileno-sorbitana (série Tween[®]) e ésteres ou éteres de polioxietileno de fórmula geral (I):



na qual n é 1-50, A é uma ligação ou -C(O)-, R é C₁₋₅₀-alquila ou fenil-C₁₋₅₀-alquila; e combinações de dois ou mais destes.

15 Os tensoativos preferidos de fórmula (I) são moléculas nas quais n é 4-24, com maior preferência 6-12, e mais preferivelmente 9; o componente R é C₁₋₅₀, preferivelmente C₄₋₂₀-alquila e mais preferivelmente C₁₂-alquila.

20 Octil-fenóxi-polioxietanóis e ésteres de polioxietileno-sorbitana são descritos em "Surfactant systems" Eds: Attwood e Florence (1983, Chapman e Hall). Octil-fenóxi-polioxietanóis (os octoxinóis), incluindo t-octil-fenóxi-polietóxi-etanol (Triton X-100) também são descritos na Entrada 6858 do Merck Index (Página 1.162, 12th Edition, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N. J., USA; ISBN 0911910-12-3). Os ésteres de
25 polioxietileno-sorbitana, incluindo monooleato de polioxietileno-sorbitana (Tween 80) são descritos na Entrada 7742 do Merck Index (Página 1.308, 12th Edition, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N. J., USA; ISBN 0911910-12-3). Ambos podem ser manufaturados usando-se métodos nestas, ou podem

ser obtidos de fontes comerciais tal como Sigma Inc.

Os tensoativos não-iônicos particularmente preferidos incluem Triton X-45, t-octil-fenóxi-polietóxi-etanol (Triton X-100), Triton X-102, Triton X-114, Triton X-165, Triton X-205, Triton X-305, Triton N-57, Triton N-101, Triton N-128, Breij 35, polioxietileno-9-lauril-éter (Laureth 9) e polioxietileno-9-estearil-éter (Steareth 9). Triton X-100 e Laureth 9 são particularmente preferidos. Também é particularmente preferido o éster de polioxietileno-sorbitana, monooleato de polioxietileno-sorbitana (Tween 80TM).

Outros polioxietileno-éteres de fórmula geral (I) adequados são selecionados do seguinte grupo: polioxietileno-8-estearil-éter, polioxietileno-4-lauril-éter, polioxietileno-35-lauril-éter, e polioxietileno-23-lauril-éter.

Nomes e termos alternativos para polioxietileno-lauril-éter são descritos no registro de CAS. O número de registro do CAS de polioxietileno-9-lauril-éter é: 9002-92-0. Polioxietileno-éteres tal como o polioxietileno-lauril-éter são descritos no Merck Index (12th ed: entrada 7717, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA; ISBN 0911910-12-3). Laureth 9 é formado pela reação de óxido de etileno com dodecil-álcool, e possui uma média de nove unidades de óxido de etileno.

Dois ou mais tensoativos não-iônicos de grupos diferentes de tensoativos descritos podem estar presentes na formulação de vacina aqui descrita. Em particular, uma combinação de um éster de polioxietileno-sorbitana tal como monooleato de polioxietileno-sorbitana (Tween 80TM) e um octoxinol tal como t-octil-fenóxi-polietóxi-etanol (Triton) X-100TM é preferida. Outra combinação particularmente preferida de tensoativos não-iônicos compreende Laureth-9 mais um éster de polioxietileno-sorbitana ou um octoxinol ou ambos.

Tensoativos não-iônicos tais como aqueles discutidos acima

possuem as seguintes concentrações preferidas na composição de vacina final: ésteres de polioxietileno-sorbitana tal como Tween 80[®]: 0,01% a 1%, mais preferivelmente de cerca de 0,1% (p/v); octil- ou nonil-fenóxi-polioxietanóis tais como Triton X-100[®] ou outros detergentes na série Triton: 0,001% a 0,1%, mais preferivelmente 0,005% a 0,02% (p/v); polioxietileno-éteres de fórmula geral (I) tal como Laureth-9: 0,1% a 20%, preferivelmente 0,1% a 10% e mais preferivelmente de 0,1% a 1% ou cerca de 0,5% (p/v).

Para certas formulações de vacina, outros componentes de vacina podem ser incluídos na formulação. Como tais as formulações da presente invenção também podem compreender um ácido biliar ou um seu derivado, em particular na forma de um sal. Estes incluem derivados de ácido cólico e seus sais, em particular sais de sódio de ácido cólico ou de derivados de ácido cólico. Exemplos de ácidos biliares e de seus derivados incluem ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico e derivados tais como glico-, tauro-, amidopropil-1-propanossulfônico-, amidopropil-2-hidróxi-1-propanossulfônico- derivados dos ácidos biliares acima mencionados, ou N,N-bis(3-D-gliconoamidopropil)-desoxicolamida. Um exemplo particularmente preferido é desoxicolato de sódio (NaDOC) que pode estar presente na dose de vacina final.

Também são proporcionados pela presente invenção kit farmacêuticos compreendendo um dispositivo de administração de vacina cheio com uma vacina de acordo com a invenção. Tais dispositivos de administração incluem mas não se limitam aos dispositivos de agulha, dispositivos de jato de líquido, dispositivos de pó, e aos dispositivos de borrifo (para uso nasal).

As preparações de antígeno de vírus da influenza de acordo com a invenção podem ser derivadas do método de ovo embrionário convencional, ou podem ser derivadas de quaisquer outros métodos de

geração convencionais usando cultura em tecido para o crescimento de vírus ou expressão de antígenos de superfície de vírus da influenza recombinantes. Substratos celulares apropriado para o crescimento de vírus incluem por exemplo células de rim de cão tais como MDCK ou células de um clone de MDCK, células MDCK-semelhantes, células de rim de macaco tais como células AGMK incluindo células Vero, linhagens de células de porco adequadas, ou qualquer outro tipo de célula de mamífero apropriado para a produção de vírus da influenza para propósitos de vacina. Os substratos celulares adequados também incluem células humanas por exemplo células MRC-5. Substratos celulares apropriados não se limitam às linhagens celulares; por exemplo células primárias tais como fibroblastos de embrião de galinha também estão incluídas.

A preparação de antígeno de vírus da influenza pode ser produzida por qualquer um de numerosos processos comercialmente aplicáveis, por exemplo o processo flu dividida descrito nas patentes DD 300.833 e DD 211.444, aqui incorporadas como referências. Tradicionalmente flu dividida foi produzida usando um tratamento de solvente/detergente, tal como fosfato de tri-n-butila, ou dietil-éter em combinação com Tween[®] (conhecido como “divisão por Tween-éter”) e este processo ainda é usado em algumas fábricas de produção. Outros agentes de divisão agora empregados incluem detergentes ou enzimas proteolíticas ou sais biliares, por exemplo desoxicolato de sódio como descrito na patente DD 155.875, aqui incorporada como referência. Detergentes que podem ser usados como agentes de divisão incluem detergentes catiônicos por exemplo brometo de cetil-trimetil-amônio (CTAB), outros detergentes iônicos por exemplo lauril-sulfato, taurodesoxicolato, ou detergentes não-iônicos tais como aqueles descritos acima incluindo Triton X-100 (por exemplo em um processo descrito em Lina *et al.*, 2000, *Biologicals* 28, 95-103) e Triton N-101, ou combinações de quaisquer dois ou mais detergentes.

O processo de preparação de uma vacina dividida incluirá numerosas etapas de filtração e/ou outras etapas de separação tais como etapas de ultracentrifugação, ultrafiltração, centrifugação zonal e cromatografia (por exemplo troca iônica) em uma variedade de combinações, e opcionalmente uma etapa de inativação por exemplo com calor, formaldeído ou β -propiolactona ou U.V. que pode ser realizada antes ou após a divisão. O processo de divisão pode ser realizado como um processo em batelada, contínuo ou semi-contínuo.

As preparações de antígeno de flu dividido preferidas de acordo com a invenção compreendem uma quantidade residual de Tween 80 e/ou de Tween X-100 restante do processo de produção, embora estes possam ser adicionados ou suas concentrações ajustadas após a preparação do antígeno dividido. Preferivelmente ambos Tween 80 e Tween X-100 estão presentes. As faixas preferidas para as concentrações finais destes tensoativos não-iônicos na dose de vacina são:

Tween 80: 0,01% a 1%, com maior preferência cerca de 0,1% (v/v)

Tween X-100: 0,001% a 0,1% (p/v), com maior preferência 0,005% a 0,02% (p/v).

Alternativamente as preparações de antígeno de vírus da influenza de acordo com a invenção podem ser derivadas de uma fonte diferente de vírus da influenza vivo, por exemplo o antígeno de hemaglutinina pode ser produzido recombinantemente.

A invenção será agora descrita adicionalmente nos seguintes exemplos não limitantes.

Exemplo 1 - Preparação da preparação de antígeno de vírus da influenza usando succinato de α -tocoferol como um estabilizador para uma vacina livre de conservante (vacina reduzida em tiomersal)

Vacina dividida monovalente foi preparada de acordo com o

seguinte procedimento.

Preparação de inóculo de vírus

No dia da inoculação de ovos embrionários um inóculo fresco é preparado por misturação da batelada de cultura de microorganismo de trabalho com uma solução salina tamponada com fosfato contendo sulfato de gentamicina a 0,5 mg/mL e hidrocortisona a 25 µg/mL (dependente de cepa de vírus. O inóculo de vírus é mantido a -28°C.

Inoculação de ovos embrionários

Ovos embrionados de nove a onze dias de idade são usados para a replicação de vírus. As cascas são descontaminadas. Os ovos são inoculados com 0,2 mL de inóculo de vírus. Os ovos inoculados são incubados na temperatura apropriada (dependente da cepa de vírus) por 48-96 horas. No final do período de incubação, os embriões são mortos por esfriamento e os ovos são armazenados por 12-60 horas a 2-8°C.

Colheita

Os fluido alantóico dos ovos embrionários esfriados é colhido. Normalmente, 8-10 mL de fluido alantóico cru são coletados por ovo.

Concentração e purificação do vírus inteiro do fluido alantóico

1. Clarificação

O fluido alantóico colhido é clarificado por centrifugação de velocidade moderada (faixa: 4.000-14.000 g).

2. Etapa de adsorção

Para se obter um gel de CaHPO_4 no reunido de vírus clarificado, soluções de Na_2HPO_4 a 0,5 mol/L e de CaCl_2 a 0,5 mol/L são adicionadas para se alcançar uma concentração final de CaHPO_4 de 1,5 g a 3,5 g de CaHPO_4 /Litro dependendo da cepa de vírus.

Após a sedimentação por pelo menos 8 horas, o sobrenadante é removido e o sedimento contendo o vírus da influenza é ressolubilizado pela adição de uma solução de EDTA- Na_2 a 0,26 mol/L, dependendo da

quantidade de CaHPO_4 utilizada.

3. Filtração

O sedimento ressuspenso é filtrado sobre uma membrana de filtro de 6 μm .

5 4. Centrifugação em gradiente de sacarose

O vírus da influenza é concentrado por centrifugação isopícnica em um gradiente linear de sacarose (0,55% (p/v)) contendo 100 $\mu\text{g/L}$ de tiomersal. A vazão de fluxo é de 8-15 Litros por hora.

No final da centrifugação, o teor do rotor é recuperado por quatro frações diferentes (a sacarose é medida em um refratômetro):

- fração 1 55-52% de sacarose
- fração 2 aproximadamente 52-38% de sacarose
- fração 3 38-20% de sacarose*
- fração 4 20-0% de sacarose

15 * dependendo da cepa de vírus: fração 3 pode ser reduzida para 15% de sacarose.

Para outra preparação de vacina, apenas as frações 2 e 3 são usadas.

20 A fração 3 é lavada por diafiltração com solução-tampão de fosfato com o propósito de reduzir o teor de sacarose para aproximadamente abaixo de 6%. O vírus da influenza presente nesta fração diluída é pelletizado para remover os contaminantes solúveis.

25 A pelota é ressuspensa e totalmente misturada para se obter uma suspensão homogênea. A fração 2 e a pelota ressuspensa da fração 3 são reunidas e a solução-tampão de fosfato é adicionada para se obter um volume de aproximadamente 40 litros. Este produto é o concentrado de vírus inteiro monovalente.

5. Centrifugação em gradiente de sacarose com desoxicolato de sódio

O concentrado de vírus da influenza inteiro monovalente é

aplicado em uma ultracentrífuga ENI-Mark II. O rotor K3 contém um gradiente de sacarose linear (0,55% p/v)) no qual é adicionalmente posicionada uma camada de um gradiente de desoxicolato de sódio. Tween 80 está presente durante a divisão em até 0,1% (p/v) e succinato de tocoferol é adicionado para vírus de cepa B em até 0,5 mM. A concentração máxima de desoxicolato de sódio é de 0,7-1,5% (p/v) e é dependente da cepa. A vazão de fluxo é 8-15 Litros por hora.

No final da centrifugação, o teor do rotor é recuperado por três frações diferentes (a sacarose é medida em um refratômetro). A fração 2 é usada para processamento adicional. O teor de sacarose para limites de fração (47-18%) varia de acordo com as cepas e é fixado após a avaliação.

6. Filtração estéril

A fração de vírus dividido é filtrada sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 μm . A solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e (para vírus de cepa B) 0,5 mM de succinato de tocoferol é usada para diluição. O volume final da fração 2 filtrada é 5 vezes o volume da fração original.

7. Inativação

O material monovalente filtrado é incubado a $22\pm 2^\circ\text{C}$ por no máximo 84 horas (dependendo das cepas de vírus, esta incubação pode ser encurtada). Solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 é então adicionada com o propósito de reduzir o teor de proteína total para o máximo de 250 $\mu\text{g/mL}$. Para os vírus de cepa B, uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e 0,25 mM de succinato de tocoferol é aplicada para diluição a fim de reduzir o teor de proteína total para 250 $\mu\text{g/mL}$. Formaldeído é adicionado para uma concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$ e a inativação ocorre a $20\pm 2^\circ\text{C}$ por pelo menos 72 horas.

8. Ultrafiltração

O material de vírus dividido inativado é concentrado pelo menos 2 vezes em uma unidade de ultrafiltração, equipada com membranas de acetato de celulose com MWCO de 20 kDa. O material é subsequentemente lavado com solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e seguido por solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween. Para o vírus de cepa B é usada para lavagem uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween 80 e 0,1 mM de succinato de tocoferol.

9. Filtração estéril final

O material após a ultrafiltração é filtrado sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 μm . Membranas de filtro são enxaguadas e o material é diluído se necessário de tal modo que a concentração de proteína não exceda 500 $\mu\text{g/mL}$ com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween 80 e (para vírus de cepa B) 0,1 mM de succinato de tocoferol;

10. Armazenagem

O volume final monovalente é armazenado a 2-8°C por um máximo de 18 meses.

Estabilidade

Tabela 1. Comparação do teor de HA ($\mu\text{g/mL}$) dependente do tempo medido por SRD em volumes finais monovalentes.

Cepa	Estabilizador	Após a produção	4 semanas a 30°C	6 meses a 2-8°C	12 meses a 2-8°C
B/Yamanashi/166/98	Succinato de tocoferila (mercúrio residual a 3 $\mu\text{g/mL}$)	169	139 (82%)	172 (>100%)	ND
B/Yamanashi/166/98	Tiomersal (108 $\mu\text{g/mL}$)	192	160 (83%)	186 (97%)	178 (93%)
B/Yamanashi/166/98	Nenhum (mercúrio residual a 3 $\mu\text{g/mL}$)	191	122 (60%)	175 (92%)	154 (81%)
B/Johannesburg/5/99	Succinato de tocoferila (mercúrio residual a 4 $\mu\text{g/mL}$)	166	183 (>100%)	158 (95%)	179 (>100%)
B/Johannesburg/5/99	Succinato de tocoferila (mercúrio residual a 4 $\mu\text{g/mL}$)	167	179 (>100%)	158 (95%)	178 (>100%)
B/Johannesburg/5/99	Succinato de tocoferila (mercúrio residual a 3 $\mu\text{g/mL}$)	144	151 (>100%)	130 (90%)	145 (>100%)
B/Johannesburg/5/99*	Tiomersal	159	ND	172 (>100%)	154 (97%)
B/Johannesburg/5/99**	Nenhum	169	107 (63%)	153 (90%)	ON

* produzido de acordo com FLUARIXTM licenciado, ** produzido de acordo com o exemplo 1 sem succinato de tocoferila, ON: em andamento, ND: não determinado.

Exemplo 2 - Preparação de vacina de influenza usando succinato de α -tocoferol como um estabilizador para uma vacina reduzida em tiomersal

5 Volumes finais monovalentes de três cepa, A/New Caldonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panama/200/99 (H3N2) Resvis-17 e B/Yamanashi/166/98 foram produzidos de acordo com o método descrito no Exemplo 1.

Reunião

10 Os volumes finais monovalentes em quantidade apropriada foram reunidos para uma concentração de HA final de 30 $\mu\text{g/mL}$ para A/New

Caldonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panama/200/99 (H3N2) Resvis-17, respectivamente e de 39 µg/mL para B/Yamanashi/166/98. Tween 80 e Triton X-100 foram ajustados para 580 µg/mL e 90 µg/mL, respectivamente. O volume final foi ajustado para 3 L com solução salina tamponada com fosfato.

O reunido trivalente foi filtrado terminando com uma membrana de acetato de celulose de 0,8 µm para se obter o volume final trivalente. Seringas foram cheias, cada uma, com pelo menos 0,5 mL de volume final trivalente.

Tabela 2. Comparação do teor de HA dependente do tempo medido por SRD em volumes finais trivalentes que foi recuperado de seringas.

Formulação de vacina	Cepa	0 mês	2 meses	4 meses	6 meses
Vacina de influenza sem estabilizador	A/NCal/20/99	33 (32-34)	32 (31-33)	36 (34-38)	31 (30-32)
	A/Pan/2007/99	29 (27-31)	31 (28-34)	34 (32-36)	32 (31-33)
	B/Yam/166/98	36 (34-38)	33 (32-34)	32 (30-34)	31 (29-33)
Vacina de influenza contendo succinato de alfa-tocoferol	A/NCal/20/99	31 (30-32)	32 (31-33)	36 (34-38)	32 (31-33)
	A/Pan/2007/99	33 (30-36)	33 (30-36)	36 (35-37)	33 (31-35)
	B/Yam/166/98	37 (35-39)	36 (34-38)	38 (35-41)	36 (33-39)

Exemplo 3 - Método de SRD usado para medir o teor de hemaglutinina

Placas de vidro (12,4-10,0 cm) são revestidas com um gel de agarose contendo uma concentração de soro de HA anti-influenza que é recomendado por NIBSC. Após o endurecimento do gel, 72 cavidades de amostra (Ø 3 mm) são perfuradas para dentro da agarose. 10 Microfiltros de diluições apropriadas de referência e a amostra são carregados nas cavidades. As placas são incubadas por 24 horas na temperatura ambiente (20-25°C) em uma câmara úmida. Após isto, as placas são embebidas durante a noite com solução de NaCl e lavadas brevemente em água destilada. O gel é então prensado e seco. Quando completamente secas as placas são coradas com solução de Coomassie Brilliant Blue por 10 min e descoradas duas vezes em uma mistura de metanol e ácido acético até que zonas coradas claramente definidas se tornem visíveis. Após a secagem das placas o diâmetro das zonas coradas circundando as cavidades de antígeno é medido em duas direções em ângulos retos. Alternativamente o equipamento para medir a superfície pode ser empregado. Curvas de resposta de dose de diluições de antígeno contra a

superfície são construídas e os resultados são calculados de acordo com os métodos de ensaio de razão de inclinação padrão (Finney, D. J. (1952), Statistical Methods in Biology Assay. London: Griffin, citado em: Wood, J. M., et al. (1977). *J. Biol. Standard* 5, 237-247).

5 **Exemplo 4 - Teste clínico da vacina de influenza estabilizada com α -tocoferol (tiomersal reduzida)**

Seringas obtidas como descrito no Exemplo 2 são usadas no teste clínico.

H3N2: A/Panama/200/99 (H3N2) Resvis-17

H1N1: A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116

B: B/Yamanashi/166/98

Tabela 3

	Adultos de 18-60 anos						
		reduzida em tiomersal			contendo tiomersal		
		H3N2	H1N1	B	H3N2	H1N1	B
pré-vac.	GMT	47	41	111	55	37	102
	Título <10 [%]	10,3%	13,8%	1,7%	5,3%	12,3%	8,8%
	Título $\geq$ 40, SPR [%]	60,3%	55,2%	75,9%	70,2%	52,6%	75,4%
pós-vac.	Taxa de soroconversão [%]	10,3%	13,8%	1,7%	5,3%	12,3%	8,8%
	Aumento significativo na taxa de anticorpos [%]	58,6%	74,1%	58,6%	63,2%	73,7%	52,6%
	Soroconversões [%]	58,6%	74,1%	58,6%	63,2%	73,7%	52,6%
	GMT	328	525	766	324	359	588
	Veze GMT	7,3	13,0	6,9	5,9	9,8	5,9
	Título $\geq$ 40, SPR [%]	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

n.d. = C.I. para proporção $p=n/N$ não está definido, porque $p*(1-p)*N < 9$

n/N = responsivos (n) como parte do número de indivíduos da (sub)população (N), isto é soroconversões ou aumento significativo, veja também: CPMAP/BWP/214/96 12 de Março de 1997, op. 17 ff.

GMT = título médio geométrico, recíproco

95% C.I. = intervalo de confiança de 95%,

SPR = taxa de soroproteção: proporção de indivíduos com um título protetor de pré- ou pós-vacinação de ≥ 40

Título = título de anticorpo-HI

Taxa de soroconversão = proporção de indivíduos com aumento de anticorpo de < 10 de pré-vacinação a ≥ 40 de pós-vacinação

Veze GMT = aumento de vezes de GMT

Aumento significativo = proporção de indivíduos com um título de anticorpo < 10 pré-vacinação e aumento de anticorpo de 4 vezes de pós-vacinação (duas etapas de título)

req. = requerimento EU

Soroconversões = neg a pos ou g.e. 4-vezes (neg: título < 10 , pos: título ≥ 40) = proporção de indivíduos quer com soroconversão (< 10 a ≥ 40) quer com aumento significativo.

Os resultado mostram que a vacina é capaz de oferecer proteção equivalente a das vacinas contendo tiomersal como um conservante.

Exemplo 5a - Preparação da preparação de antígeno de vírus da influenza usando succinato de α -tocoferol como um estabilizador para uma vacina livre de tiomersal

A vacina dividida monovalente foi preparada de acordo com o seguinte procedimento.

Preparação de inóculo de vírus

No dia da inoculação de ovos embrionários um inóculo fresco é preparado por misturação da batelada de cultura de microorganismo de trabalho com uma solução salina tamponada com fosfato contendo sulfato de gentamicina a 0,5 mg/mL e hidrocortisona a 25 μ g/mL (dependente de cepa de vírus). O inóculo de vírus é mantido a -28°C .

Inoculação de ovos embrionários

Ovos embrionados de nove a onze dias de idade são usados para a replicação de vírus. As cascas são descontaminadas. Os ovos são inoculados com 0,2 mL de inóculo de vírus. 60.000 Ovos inoculados são incubados na temperatura apropriada (dependente da cepa de vírus) por 48-96 horas. No final do período de incubação, os embriões são mortos por esfriamento e os ovos são armazenados por 12-60 horas a $2-8^{\circ}\text{C}$.

Colheita

Os fluido alantóico dos ovos embrionários esfriados é colhido. Normalmente, 8-10 mL de fluido alantóico cru são coletados por ovo.

Concentração e purificação do vírus inteiro do fluido alantóico

Clarificação

O fluido alantóico colhido é clarificado por centrifugação de velocidade moderada (faixa: 4.000-14.000 g).

Etapa de precipitação

- 5 Solução de sulfato de amônio saturada é adicionada no reunido de vírus clarificado para se alcançar uma concentração final de 0,5 mol/L. Após a sedimentação por pelo menos 1 hora, o precipitado é removido por filtração sobre filtros profundos (tipicamente de 0,5 μm).

Filtração

- 10 O volume de vírus inteiro cru clarificado é filtrado sobre membranas de filtro terminando com uma membrana estéril validada (tipicamente de 0,2 μm).

Ultrafiltração

- 15 O volume de vírus inteiro cru clarificado estéril é concentrado pelo menos 6 vezes sobre um cassete equipado com membrana MWCO BIOMAX[®] de 1.000 kDa. O retido concentrado é lavado com solução salina tamponada com fosfato pelo menos 1,8 vezes.

Centrifugação em gradiente de sacarose

- 20 O vírus da influenza é concentrado por centrifugação isopícnica em um gradiente linear de sacarose (0,55% (p/v)). A vazão de fluxo é de 8-15 Litros por hora.

No final da centrifugação, o teor do rotor é recuperado por quatro frações diferentes (a sacarose é medida em um refratômetro):

- | | | | |
|----|---|----------|------------------------------------|
| 25 | - | fração 1 | 55-52% de sacarose |
| | - | fração 2 | aproximadamente 52-38% de sacarose |
| | - | fração 3 | 38-20% de sacarose* |
| | - | fração 4 | 20-0% de sacarose |

* dependendo da cepa de vírus: fração 3 pode ser reduzida para 15% de sacarose.

Para outra preparação de vacina, é usada quer apenas a fração 2 quer a fração 2 juntamente com uma outra fração 3 adicionalmente purificada.

A fração 3 é lavada por diafiltração com solução-tampão de fosfato com o propósito de reduzir o teor de sacarose para aproximadamente abaixo de 6%. Opcionalmente esta etapa pode ser omitida. O vírus da influenza presente nesta fração diluída é pelotizado para remover os contaminantes solúveis.

A pelota é ressuspensa e totalmente misturada para se obter uma suspensão homogênea. A fração 2 e a pelota ressuspensa da fração 3 são reunidas e a solução-tampão de fosfato é adicionada para se obter um volume de aproximadamente 40 litros. Este produto é o concentrado de vírus inteiro monovalente.

Centrifugação em gradiente de sacarose com desoxicolato de sódio

O concentrado de vírus da influenza inteiro monovalente é aplicado em uma ultracentrífuga ENI-Mark II. O rotor K3 contém um gradiente de sacarose linear (0,55% p/v)) no qual é adicionalmente posicionada uma camada de um gradiente de desoxicolato de sódio. Tween 80 está presente durante a divisão em até 0,1% (p/v) e succinato de tocoferol é adicionado para vírus de cepa B em até 0,5 mM. A concentração máxima de desoxicolato de sódio é de 0,7-1,5% (p/v) e é dependente da cepa. A vazão de fluxo é 8-15 Litros por hora.

No final da centrifugação, o teor do rotor é recuperado por três frações diferentes (a sacarose é medida em um refratômetro). A fração 2 é usada para processamento adicional. O teor de sacarose para limites de fração (47-18%) varia de acordo com as cepas e é fixado após a avaliação.

Filtração estéril

A fração de vírus dividido é filtrada sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 μm . A solução-tampão de fosfato

contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e (para vírus de cepa B) 0,5 mM de succinato de tocoferol é usada para diluição. O volume final da fração 2 filtrada é 5 vezes o volume da fração original.

Inativação

O material monovalente filtrado é incubado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por no máximo 84 horas (dependendo das cepas de vírus, esta incubação pode ser encurtada). Solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 é então adicionada com o propósito de reduzir o teor de proteína total para o máximo de 450 $\mu\text{g/mL}$. Para os vírus de cepa B, uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e 0,25 mM de succinato de tocoferila é aplicada para diluição a fim de reduzir o teor de proteína total para 450 $\mu\text{g/mL}$. Formaldeído é adicionado para uma concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$ e a inativação ocorre a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ por pelo menos 72 horas.

Ultrafiltração

O material de vírus dividido inativado é concentrado pelo menos 2 vezes em uma unidade de ultrafiltração, equipada com membranas de acetato de celulose com MWCO de 20 kDa. O material é subsequenteiramente lavado com solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e seguido por solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween. Para o vírus de cepa B é usada para lavagem uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween 80 e 0,1 mM de succinato de tocoferila.

Filtração estéril final

O material após a ultrafiltração é filtrado sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 μm . Membranas de filtro são enxaguadas e o material é diluído se necessário de tal modo que a concentração de proteína não exceda 500 $\mu\text{g/mL}$ com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween 80 e, especificamente

para vírus de cepa B, 0,1 mM de succinato de tocoferila.

Armazenagem

O volume final monovalente é armazenado a 2-8°C por um máximo de 18 meses.

5 Estabilidade

Tabela 4. Comparação do teor de HA ($\mu\text{g/mL}$) dependente do tempo medido por SRD em volumes finais monovalentes.

Cepa	Estabilizador	Após a produção	4 semanas a 30°C	6 meses a 2-8°C
B/Johannesburg/5/99	Succinato de tocoferol	214	196 (92%)	206 (96%)
B/Johannesburg/5/99**	Nenhum	169	107 (63%)	153 (90%)

** produzido de acordo com o exemplo 1 sem succinato de tocoferila.

Exemplo 5b - Preparação da preparação de antígeno de vírus da influenza usando succinato de α -tocoferol como um estabilizador para uma vacina livre de tiomersal

Uma variação preferida do método descrito no Exemplo 5a é a seguinte:

A colheita do vírus inteiro é seguida pela etapa de precipitação (precipitação com sulfato de amônio). Esta é seguida pela etapa de clarificação na qual o fluido é clarificado por centrifugação de velocidade moderada (faixa de 4.00-14.000 g). Assim a ordem das etapas de precipitação e clarificação é invertida comparada com o Exemplo 5a.

Etapas de filtração estéril, ultrafiltração e ultracentrifugação (centrifugação em gradiente de sacarose) seguem como o Exemplo 5a.

Contudo, não pe necessária a etapa de reprocessamento das frações resultantes da etapa de ultracentrifugação.

As etapas restantes no processo são como as descritas no Exemplo 5a.

Assim, o processo resumido neste exemplo é o seguinte:

Colheita

Precipitação (sulfato de amônio)

Clarificação

Filtração estéril

Ultrafiltração

Ultracentrifugação

5 Divisão (preferivelmente com desoxicolato de sódio))

Filtração estéril

Inativação

Ultrafiltração

Filtração estéril final

10 Outra variação preferida do Exemplo 5a envolve uma etapa de pré-filtração antes da primeira filtração estéril. Esta usa uma membrana que não filtra esterilmente mas que permite a remoção de contaminantes como por exemplo albumina antes da filtração estéril. Isto pode resultar em um melhor rendimento. Uma membrana adequada para a pré-filtração é de cerca de 0,8
15 µm a cerca de 1,8 µm, por exemplo de 1,2 µm. A etapa de pré-filtração pode ser utilizada no esquema do Exemplo 5a ou do Exemplo 5b.

Exemplo 6 - Preparação de vacina de influenza usando succinato de α -tocoferol como um estabilizador para uma vacina livre de tiomersal

20 Volumes finais monovalentes de três cepas, A/New Caldonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panama/2007/99 (H3N2) Resvis-17 e B/Yamanashi/166/98 foram produzidos de acordo com o método descrito no Exemplo 5.

Reunião

25 Os volumes finais monovalentes em quantidade apropriada foram reunidos para uma concentração de HA final de 30 µg/mL para A/New Caldonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panama/200/99 (H3N2) Resvis-17, respectivamente e de 36 µg/mL para B/Johannesburg/5/97. Tween 80 e Triton X-100 foram ajustados para 580 µg/mL e 90 µg/mL, respectivamente. O volume final foi ajustado para 3 L com solução salina tamponada com fosfato.

O reunido trivalente foi filtrado terminando com uma membrana de acetato de celulose de 0,8 µm para se obter o volume final trivalente. Seringas foram cheias, cada uma, com pelo menos 0,5 mL de volume final trivalente.

Tabela 5. Comparação do teor de HA dependente do tempo medido por SRD em volumes finais trivalentes que foi recuperado de seringas.

Formulação de vacina	Cepa	0 mês	4 meses a 30°C	6 meses a 2-8°C
Vacina de influenza sem estabilizador	A/NCal/20/99	31	32	30
	A/Pan/2007/99	31	34	33
	B/Joh/5/99*	35	25	31
Vacina de influenza contendo succinato de alfa-tocoferol	A/NCal/20/99	34	35	34
	A/Pan/2007/99	33	33	34
	B/Joh/5/99**	29	25	28

* Formulação baseou-se em concentração alvo de 39 µg/mL.

** Formulação baseou-se em concentração alvo de 34 µg/mL.

Exemplo 7 - Preparação da preparação de antígeno de vírus da influenza usando lauril-sulfato de sódio como estabilizador para uma vacina livre de conservante (vacina reduzida em tiomersal)

Concentrado de vírus inteiro monovalente de B/Johannesburg/5/99 foi obtido como descrito no Exemplo 1

Centrifugação em gradiente de sacarose com desoxicolato de sódio

O concentrado de vírus da influenza inteiro monovalente é aplicado em uma ultracentrífuga ENI-Mark II. O rotor K3 contém um gradiente de sacarose linear (0,55% p/v)) no qual é adicionalmente posicionada uma camada de um gradiente de desoxicolato de sódio. Tween 80 está presente durante a divisão em até 0,1% (p/v). A concentração máxima de desoxicolato de sódio é de 0,7-1,5% (p/v) e é dependente da cepa. A vazão de fluxo é 8-15 Litros por hora.

No final da centrifugação, o teor do rotor é recuperado por três frações diferentes (a sacarose é medida em um refratômetro). A fração 2 é usada para processamento adicional. O teor de sacarose para limites de fração (47-18%) varia de acordo com as cepas e é fixado após a avaliação.

Filtração estéril

Foi retirada uma amostra de fração 2 de 10 mL para processamento adicional. A fração de vírus dividido é filtrada sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 μm . A solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e 0,5 mM de lauril-sulfato de sódio é usada para diluição. O volume final da fração 2 filtrada é 5 vezes o volume da fração original.

Inativação

O material monovalente filtrado é incubado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por no máximo 84 horas (dependendo das cepas de vírus, esta incubação pode ser encurtada). Solução salina tamponada com fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e 0,5 mM de lauril-sulfato de sódio é então adicionada com o propósito de reduzir o teor de proteína total para o máximo de 250 $\mu\text{g/mL}$. Formaldeído é adicionado para uma concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$ e a inativação ocorre a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ por pelo menos 72 horas.

Ultrafiltração

O material de vírus dividido inativado é concentrado pelo menos 2 vezes em uma unidade de ultrafiltração, equipada com membranas de acetato de celulose com MWCO de 20 kDa. O material é subsequenteiramente lavado com 4 volumes de solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween e 0,5 mM de lauril-sulfato de sódio.

Filtração estéril final

O material após a ultrafiltração é filtrado sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 μm . Membranas de filtro são enxaguadas e o material é diluído se necessário de tal modo que a concentração de proteína não exceda 500 $\mu\text{g/mL}$ com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween 80 e 0,5 mM de lauril-sulfato de sódio.

Armazenagem

O volume final monovalente é armazenado a $2-8^\circ\text{C}$.

Tabela 7. Comparação do teor de HA dependente do tempo medido por SRD em volumes finais monovalentes.

	Estabilizador	Após a produção	4 semanas a 30°C
B/Johannesburg/5/99	Nenhum *	182	139 (77%)
B/Johannesburg/5/99	Lauril-sulfato de sódio	288	264 (92%)

* Produzido de acordo com o Exemplo 7 sem a adição de lauril-sulfato de sódio.

Exemplo 8 - Preparação da preparação de antígeno de vírus da influenza usando Plantacare ou Laureth-9 como estabilizador para uma vacina

livre de conservante (vacina reduzida em tiomersal)

Concentrado de vírus inteiro monovalente de B/Yamanashi/166/98 foi obtido como descrito no Exemplo 1

Fragmentação

O concentrado de vírus da influenza inteiro monovalente é diluído para uma concentração de proteína de 1.000 µg/mL com solução salina tamponada com fosfato de pH 7,4. Quer Plantacare® 2000 UP quer Laureth-9 é adicionado para uma concentração final de 1% (p/v). O material é ligeiramente misturado por 30 min. Então uma camada de material é posicionada sobre uma camada de sacarose de 15% (p/p) em uma caçamba. Ultracentrifugação em um Bechman swing out rotor SW 28 é realizada por 2 h a 25.000 rpm e a 20°C.

Filtração estéril

Um sobrenadante é retirado para processamento adicional. A fração de vírus dividido é filtrada sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 µm.

Inativação

Solução salina tamponada com fosfato é adicionada se necessária com o propósito de reduzir a concentração de proteína total para o máximo de 500 µg/mL. Formaldeído é adicionado para uma concentração final de 100 µg/mL e a inativação ocorre a 20±2°C por pelo menos 6 dias.

Ultrafiltração

Tween 80 e Triton X100 são ajustados no material inativado para 0,15% e 0,02% respectivamente. O material de vírus dividido inativado é concentrado pelo menos 2 vezes em uma unidade de ultrafiltração equipada com membranas de acetato de celulose com MWCO de 30 kDa. O material é subseqüentemente lavado com 4 volumes de solução salina tamponada com fosfato.

Filtração estéril final

O material após a ultrafiltração é filtrado sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 µm. Membranas de filtro são enxaguadas e o material é diluído de tal modo que a concentração de proteína não exceda 500 µg/mL com solução salina tamponada com fosfato.

Armazenagem

O volume final monovalente é armazenado a 2-8°C.

Tabela 8. Comparação do teor de HA dependente do tempo medido por SRD em volumes finais monovalentes.

	Estabilizador	Após a produção	4 semanas a 30°C
B/Yamanashi166/98	Nenhum *	143	98 (68%)
B/Yamanashi166/98	Plantacare® 2000 UP	476	477 (100%)
B/Yamanashi166/98	Laureth-9	468	494 (>100%)

Exemplo 9 - Teste clínico de vacina de influenza estabilizada com α -tocoferol (reduzida em tiomersal) em idosos via administração ID e IM

A. Preparação da preparação de antígeno de vírus da influenza

Vacina dividida monovalente foi preparada de acordo com o seguinte procedimento.

Preparação de inóculo de vírus

No dia da inoculação de ovos embrionários um inóculo fresco é preparado por misturação da batelada de cultura de microorganismo de trabalho com uma solução salina tamponada com fosfato contendo sulfato de gentamicina a 0,5 mg/mL e hidrocortisona a 25 µg/mL (dependente de cepa de vírus). O inóculo de vírus é mantido a -28°C.

Inoculação de ovos embrionários

Ovos embrionados de nove a onze dias de idade são usados para a replicação de vírus. As cascas são descontaminadas. Os ovos são inoculados com 0,2 mL de inóculo de vírus. Os ovos inoculados são incubados na temperatura apropriada (dependente da cepa de vírus) por 48-96 horas. No final do período de incubação, os embriões são mortos por esfriamento e os ovos são armazenados por 12-60 horas a 2-8°C.

Colheita

Os fluido alantóico dos ovos embrionários esfriados é colhido. Normalmente, 8-10 mL de fluido alantóico cru são coletados por ovo.

10 Concentração e purificação do vírus inteiro do fluido alantóico

1. Clarificação

O fluido alantóico colhido é clarificado por centrifugação de velocidade moderada (faixa: 4.000-14.000 g).

2. Etapa de adsorção

15 Para se obter um gel de CaHPO_4 no reunido de vírus clarificado, soluções de Na_2HPO_4 a 0,5 mol/L e de CaCl_2 a 0,5 mol/L são adicionadas para se alcançar uma concentração final de CaHPO_4 de 1,5 g a 3,5 g de CaHPO_4 /Litro dependendo da cepa de vírus.

20 Após a sedimentação por pelo menos 8 horas, o sobrenadante é removido e o sedimento contendo o vírus da influenza é ressolubilizado pela adição de uma solução de EDTA- Na_2 a 0,26 mol/L, dependendo da quantidade de CaHPO_4 utilizada.

3. Filtração

25 O sedimento ressuspensão é filtrado sobre uma membrana de filtro de 6 μm .

4. Centrifugação em gradiente de sacarose

O vírus da influenza é concentrado por centrifugação isopícnica em um gradiente linear de sacarose (0,55% (p/v)) contendo 100 $\mu\text{g/L}$ de tiomersal. A vazão de fluxo é de 8-15 Litros por hora.

No final da centrifugação, o teor do rotor é recuperado por quatro frações diferentes (a sacarose é medida em um refratômetro):

- fração 1 55-52% de sacarose
- fração 2 aproximadamente 52-38% de sacarose
- fração 3 38-20% de sacarose*
- fração 4 20-0% de sacarose

* dependendo da cepa de vírus: fração 3 pode ser reduzida para 15% de sacarose.

Para outra preparação de vacina, apenas as frações 2 e 3 são usadas.

A fração 3 é lavada por diafiltração com solução-tampão de fosfato com o propósito de reduzir o teor de sacarose para aproximadamente abaixo de 6%. O vírus da influenza presente nesta fração diluída é pelotizado para remover os contaminantes solúveis.

A pelota é ressuspensa e totalmente misturada para se obter uma suspensão homogênea. A fração 2 e a pelota ressuspensa da fração 3 são reunidas e a solução-tampão de fosfato é adicionada para se obter um volume de aproximadamente 40 litros, um volume apropriado para 120.000 ovos/batelada. Este produto é o concentrado de vírus inteiro monovalente.

5. Centrifugação em gradiente de sacarose com desoxicolato de sódio

O concentrado de vírus da influenza inteiro monovalente é aplicado em uma ultracentrífuga ENI-Mark II. O rotor K3 contém um gradiente de sacarose linear (0,55% p/v)) no qual é adicionalmente posicionada uma camada de um gradiente de desoxicolato de sódio. Tween 80 está presente durante a divisão em até 0,1% (p/v) e succinato de tocoferol é adicionado para vírus de cepa B em até 0,5 mM. A concentração máxima de desoxicolato de sódio é de 0,7-1,5% (p/v) e é dependente da cepa. A vazão de fluxo é 8-15 Litros por hora.

No final da centrifugação, o teor do rotor é recuperado por três

frações diferentes (a sacarose é medida em um refratômetro). A fração 2 é usada para processamento adicional. O teor de sacarose para limites de fração (47-18%) varia de acordo com as cepas e é fixado após a avaliação.

6. Filtração estéril

A fração de vírus dividido é filtrada sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 μm . A solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e (para vírus de cepa B) 0,5 mM de succinato de tocoferol é usada para diluição. O volume final da fração 2 filtrada é 5 vezes o volume da fração original.

7. Inativação

O material monovalente filtrado é incubado a $22\pm 2^\circ\text{C}$ por no máximo 84 horas (dependendo das cepas de vírus, esta incubação pode ser encurtada). Solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 é então adicionada com o propósito de reduzir o teor de proteína total para o máximo de 250 $\mu\text{g/mL}$. Para os vírus de cepa B, uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e 0,25 mM de succinato de tocoferol é aplicada para diluição a fim de reduzir o teor de proteína total para 250 $\mu\text{g/mL}$. Formaldeído é adicionado para uma concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$ e a inativação ocorre a $20\pm 2^\circ\text{C}$ por pelo menos 72 horas.

8. Ultrafiltração

O material de vírus dividido inativado é concentrado pelo menos 2 vezes em uma unidade de ultrafiltração, equipada com membranas de acetato de celulose com MWCO de 20 kDa. O material é subsequentemente lavado com solução-tampão de fosfato contendo 0,025% (p/v) de Tween 80 e seguido por solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween. Para o vírus de cepa B é usada para lavagem uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween 80 e 0,1 mM de succinato de tocoferol.

9. Filtração estéril final

O material após a ultrafiltração é filtrado sobre membranas de filtro terminando com uma membrana de 0,2 μm . Membranas de filtro são enxaguadas e o material é diluído se necessário de tal modo que a concentração de proteína não exceda 1.000 $\mu\text{g/mL}$ mas que a concentração de hemaglutinina exceda 180 $\mu\text{g/mL}$ com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,01% (p/v) de Tween 80 e (para vírus de cepa B) 0,1 mM de succinato de tocoferol;

10. Armazenagem

O volume final monovalente é armazenado a 2-8°C por um máximo de 18 meses.

B. Preparação da vacina de influenza

Volumes finais monovalentes de três cepas, A/New Caldonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panama/2007/99 (H3N2) Resvis-17 e B/Johannesburg/5/99 foram produzidos de acordo com o método descrito na parte A acima.

Reunião

Os volumes finais monovalentes em quantidade apropriada foram reunidos para uma concentração de HA final de 60 $\mu\text{g/mL}$ para A/New Caldonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panama/200/99 (H3N2) Resvis-17, respectivamente e de 68 $\mu\text{g/mL}$ para B/Johannesburg/5/99. Tween 80, Triton X-100 e succinato de tocoferol foram ajustados para 1.000 $\mu\text{g/mL}$, 110 $\mu\text{g/mL}$ e 160 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O volume final foi ajustado para 3 L com solução salina tamponada com fosfato. O reunido trivalente foi filtrado terminando com uma membrana de acetato de celulose de 0,8 μm para se obter o volume final trivalente. Seringas foram cheias, cada uma, com pelo menos 0,165 mL de volume final trivalente.

Administração da vacina

A vacina foi fornecida em seringas pré-cheias e foi

administrada intradermalmente na região deltóide. A agulha intradermal (ID) foi como descrita em EP1092444, possuindo um limitador de penetração de pele para garantir injeção intradermal apropriada.. Visto que a formação de uma pápula no sítio de injeção demonstra a boa qualidade da administração ID, o investigador com o indivíduo mediu o tamanho exato da pápula 30 minutos após a vacinação.

Uma dose (100 µL) continha os seguintes componentes:

Hemaglutinina de três cepas de influenza	
A/New Caldonia/20/99	6,0 µg
A/Panama/200/99	6,0 µg
B/Johannesburg/5/99	6,0 µg
Conservante tiomersal	0,4 µg - 0,8 µg

B. A vacina acima foi comparada com uma vacina de influenza dividida trivalente padrão: Fluarix®. A vacina Fluarix foi fornecida em seringas pré-cheias e foi administrada intramuscularmente no músculo deltóide. Um agulha de comprimento de pelo menos 2,5 cm (calibre 23) foi usada para garantir injeção intramuscular apropriada.

Uma dose (0,5 mL) continha os seguintes componentes:

Hemaglutinina de três cepas de influenza	
A/New Caldonia/20/99	15,0 µg
A/Panama/200/99	15,0 µg
B/Johannesburg/5/99	15,0 µg
Conservante tiomersal	50,0 µg

Resultados

A idade média do grupo total no momento da administração de vacina foi de 70,4±6,2 anos ± Desvio Padrão (D.P.), a razão de fêmea/macho foi de 1,7:1.

Resultados de imunogenicidade: Análise das variáveis de imunogenicidade foi a seguinte:							
Variável		Flu-reduz. ID (N = 65)			Fluarix® IM (N = 65)		
GMT		GMT	LL	UL	GMT	LL	UL
A/New Caledonia	Pré	99,5	76,9	128,7	90,0	70,1	115,7
	Pós	165,1	129,2	211,0	174,3	133,3	227,9
A/Panama	Pré	75,5	54,7	104,2	69,2	51,9	92,4
	Pós	128,6	99,1	166,8	164,3	126,0	214,1
B/Johannesburg	Pré	236,0	187,7	296,8	222,6	176,9	280,2
	Pós	341,2	276,0	421,7	402,4	312,1	518,9
Taxa de soroconversão		%	LL	UL	%	LL	UL
A/New Caledonia		15,4	7,6	26,5	18,5	9,9	30,0
A/Panama		20,0	11,1	31,8	29,2	18,6	41,8
B/Johannesburg		9,2	3,5	19,0	16,9	8,8	28,3
Fator de conversão		GMR	LL	UL	GMR	LL	UL
A/New Caledonia		1,7	1,4	2,0	1,9	1,6	2,3
A/Panama		1,7	1,4	2,1	2,4	1,9	3,0
B/Johannesburg		1,4	1,2	1,7	1,8	1,5	2,1
Taxa de soroconversão		%	LL	UL	%	LL	UL
A/New Caledonia	Pré	87,7	77,2	94,5	90,8	81,0	96,5
	Pos	92,3	83,0	97,5	96,9	89,3	99,6
A/Panama	Pré	75,4	63,1	85,2	81,5	70,0	90,1
	Pós	90,8	81,0	96,5	93,8	85,0	98,3
B/Johannesburg	Pré	98,5	91,7	100,0	96,9	89,3	99,6
	Pós	100,0	94,5	100,0	98,5	91,7	100,0

N: Número de indivíduos com resultados disponíveis; %: percentagem de indivíduos dentro do parâmetro dado; LL/UL: limite inferior e superior de CI de 95%; Pré: no momento da administração da vacina; Pós: 21 dias após a dose de vacina.

A dor no sítio de injeção, relatada por 10/65 (15,4%) dos vacinados, foi o sintoma mais comum após a administração IM de Fluarix®. No grupo ID, a dor foi relatada por 3/65 (4,6%) dos vacinados. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,038$; teste exato de Fischer).

5 Conseqüentemente é preferida a liberação ID de um produto reduzido em tiomersal.

Conclusões

Ambas as administrações ID e IM de uma vacina de flu reduzida em tiomersal em uma população de idosos podem proporcionar soroproteção de 100%.

10

Uma resposta comparável à vacinação em termos de títulos

médios geométricos, taxas de soroconversão e fatores de conversão foi verificada em indivíduos IM e ID vacinados onde o grupo ID recebeu 2,5 vezes menos antígeno. Não houve diferença discernível na incidência total dos sintomas sistêmicos solicitados/não-solicitados relacionados com a vacina nos dois grupos de tratamento.

Exemplo 10 - Liberação intradermal de uma vacina de influenza reduzida em tiomersal

A imunogenicidade da vacina de influenza dividida reduzida em tiomersal preparada como descrita no Exemplo 9 (exceto que a reunião foi feita independentemente e seringas não foram cheias com a vacina) foi avaliada para liberação ID em porquinhos-da-índia usando uma agulha padrão.

Grupos de 5 animais cada foram inicialmente vacinados intranasalmente com vírus da influenza inteiro trivalente inativado contendo 5 µg de cada HA em um volume total de 200 µL. Vinte e oito dias após a vacinação inicial os animais foram vacinados por rotas quer intradermal quer intramuscular. As doses intradermais contendo 0,1 µg, 0,3 µg, ou 1,0 µg de Flu dividida trivalente reduzida em tiomersal em 0,1 mL foram administradas no dorso do porquinho-da-índia usando uma agulha padrão. Uma dose intramuscular de 1,0 µg de Flu dividida trivalente reduzida em tiomersal foi administrada na perna traseira do porquinho-da-índia em um volume de 0,1 mL. Os grupos foram os seguintes:

- Grupo 1 = 0,1 µg de Flu dividida trivalente reduzida em tiomersal ID;
- Grupo 2 = 0,3 µg de Flu dividida trivalente reduzida em tiomersal ID;
- Grupo 3 = 1,0 µg de Flu dividida trivalente reduzida em tiomersal ID;
- Grupo 4 = 1,0 µg de Flu dividida trivalente reduzida em

tiomersal IM;

Quatorze dias após a vacinação os animais foram sangrados e os títulos de anticorpo induzidos pela vacinação foram avaliados usando um ensaio de inibição de hemaglutinação padrão (HI). Os resultados são mostrados na Figura 1. Respostas de HI fortes para todas as três cepas foram induzidas pela vacinação. Não foi observada resposta de dose clara sugerindo que doses muito baixas de antígeno reduzido em tiomersal ainda podem induzir respostas de anticorpo de HI muito potentes quando administradas pela rota ID. Não houve diferença significativa entre os títulos de HI induzidos pela vacinação ID ou IM. Assim, os resultados obtidos em porquinhos-da-índia confirmaram que os antígenos de influenza divididos trivalentes reduzidos em tiomersal induzem níveis semelhantes de anticorpos de HI em animais quando liberados pela rota ID comparada com a rota IM.

Exemplo 11 - Liberação intradermal de uma vacina de influenza contendo adjuvante, reduzida em tiomersal

Protocolo

Porquinhos-da-índia foram inicialmente vacinados intranasalmente no Dia 0 com 5 µg de vírus de Flu inteiros trivalente em 200µL.

Vacinação - Dia 28 -Vacina contendo 0,1 µg de HA por cepa de Flu dividido trivalente preparada como descrita no Exemplo 9 (exceto que a etapa de reunião resultou em uma concentração final de cada antígeno de 1,0 µg/mL para dar uma dose de 0,1 µg em 100 µL comparada com 60 µg/mL no Exemplo 9). A formulação trivalente final foi administrada intradermalmente usando seringas de tuberculina, quer contendo adjuvante quer não contendo adjuvante, em 100 µL.

Sangramento - Dia 42.

O efeito da adição de adjuvante foi avaliado pela medição das respostas de anticorpo pelo ensaio de HI (dia 0, 28, 42).

Todos os experimentos ID foram realizados usando uma agulha padrão.

Resultados

G1-G5 refere-se a 5 grupos de porquinhos-da-índia, 5 por grupo.

G1 0,1 µg de vacina dividida trivalente reduzida em tiomersal

G2 0,1 µg de vacina dividida trivalente reduzida em tiomersal + 50 µg de 3D- MPL

G3 0,1 µg de vacina dividida trivalente reduzida em tiomersal + 10 µg de 3D- MPL

G4 0,1 µg de vacina dividida trivalente reduzida em tiomersal + 50 µg de 3D- MPLin + 50 µg de QS21

G5 0,1 µg de vacina dividida trivalente reduzida em tiomersal + 10 µg de 3D- MPLin + 10 µg de QS21

Nota: 3D-MLPin + QS21 refere-se a uma formulação de adjuvante que compreende uma vesícula unilamelar compreendendo colesterol, possuindo uma bicamada lipídica compreendendo dioleoil-fosfatidil-colina, na qual QS21 e 3D-MPL estão associados com, ou embebidos dentro da, bicamada lipídica. Tais formulações de adjuvante são descritas em EP 0.822.831 B, cuja descrição é aqui incorporada como referência.

Títulos de HI anti-A/New Caledonia/20/99

NC	Pré-imunização	Pré-reforço	Pós-reforço
G1	5	10	92
G2	5	10	70
G3	5	11	121
G4	7	9	368
G5	5	10	243

Títulos de HI anti-A/Panama/2007/99

P	Pré-imunização	Pré-reforço	Pós-reforço
G1	5	485	7760
G2	5	279	7760
G3	5	485	8914
G4	7	485	47051
G5	5	320	17829

Títulos de HI anti-B/Johannesburg/5/99

J	Pré-imunização	Pré-reforço	Pós-reforço
G1	5	23	184
G2	5	11	121
G3	5	11	70
G4	6	15	557
G5	5	13	320

Assim, contenha ou não adjuvante o antígeno de Flu dividido trivalente reduzido em tiomersal é um imunógeno potente e é capaz de induzir respostas de HI fortes quando administrado pela rota ID ou IM. Estas respostas parecem ser pelo menos tão potentes quanto as respostas induzidas pela preparação de Fluarix padrão.

Exemplo 12- Comparação das vacinas livre de tiomersal e contendo tiomersal liberadas intradermalmente em porcos

Com o propósito de avaliar a imunogenicidade da vacina de Flu dividida (com e sem tiomersal) administrada pela rota ID foi usado o modelo em porco inicialmente vacinado. Visto que a vasta maioria da população tem experimentado pelo menos uma infecção com influenza uma vacina de influenza tem que ser capaz de reforçar uma resposta imune pré-existente. Portanto os animais foram inicialmente vacinados em um esforço para simular a situação humana.

Neste experimento porcos de 4 semanas de idade foram inicialmente vacinados pela rota intranasal. Seis grupos de cinco animais cada foram inicialmente vacinados como segue:

Grupo 1 - duas vacinações iniciais de vírus inativado inteiro trivalente (50 µg de HA cada) no dia 0 e 14; Grupo 2 - duas vacinações iniciais de vírus inativado inteiro trivalente (50 µg de HA cada) no dia 0 e 14; Grupo 3 - duas vacinações iniciais de vírus inativado inteiro trivalente (50 µg de HA cada) no dia 0; Grupo 4 - duas vacinações iniciais de vírus inativado inteiro trivalente (25 µg de HA cada) no dia 0 e 14; Grupo 5 - uma vacinação inicial de vírus inativado inteiro trivalente (25 µg de HA cada) no dia 0; Grupo 6 - duas vacinações iniciais de vírus inativado inteiro trivalente (12,5

µg de HA cada) no dia 0 e 14.

No dia 28 após a vacinação inicial, os animais foram vacinados, cada um, com 3 µg de antígeno de HA dividido trivalente (cepas A/New Caledonia H1N1, A/Panama H3N2, e B/Johannesburg) em 100 µL pela rota ID. O grupo 1 recebeu Fluarix[®] padrão contendo conservante tiomersal como antígeno de vacina. Todos os outros grupos receberam o antígeno livre de conservante.

Os resultados de HI obtidos neste experimento são mostrados na Figura 2 (Títulos de inibição de hemaglutinação anti-influenza induzidos em porcos inicialmente vacinados com uma variedade de doses de antígeno e vacinados com 3 microgramas de antígeno de influenza trivalente com e sem tiomersal pela rota intradermal).

Títulos de HI relativamente baixos são induzidos para a cepa B neste experimento e o *background* contra a cepa A/H3N2 é alto. Um efeito benéfico em termos de resposta à vacinação é observada quando a dose de vacina inicial é reduzida. Em quase todos os casos, a redução na concentração de antígeno ou no número de doses de vacina inicial (de duas vacinações iniciais com 50 µg) resultou em uma resposta aumentada à vacinação. Embora a resposta dos animais nos Grupos 1 e 2, que foram duas vezes inicialmente vacinados com 50 µg, à vacinação não seja tão evidente, parece que o antígeno livre de conservante (Grupo 2) funciona pelo menos tão bem quanto Fluarix[®] (Grupo 1) sob estas condições. Uma resposta forte à vacinação com antígeno de influenza trivalente livre de conservante administrado pela rota ID nos animais alternativamente inicialmente vacinados (Grupos 3-6) é clara e esta resposta é vista até mesmo na cepa B, embora os títulos de HI permaneçam baixos.

REIVINDICAÇÕES

1. Preparação de vírus da influenza inativado, caracterizada pelo fato de que compreende um antígeno de hemaglutinina (AH) estabilizado na ausência de tiomersal, ou em níveis de tiomersal de 5µg/mL ou menos, em
5 que a hemaglutinina é detectável por um ensaio de SRD, e em que a preparação compreende succinato de α -tocoferol em uma quantidade suficiente para estabilizar a HA.
2. Preparação de vírus da influenza inativado de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o succinato de α -tocoferol está
10 presente em uma concentração entre 1 µg/mL e 10 mg/mL.
3. Preparação de vírus da influenza inativado de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o succinato de α -tocoferol está presente em uma concentração entre 10 µg/mL e 500 µg/mL.
4. Preparação de vírus da influenza inativado de acordo com
15 qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a preparação de antígeno de vírus da influenza é selecionada do grupo consistindo de preparações de antígeno de vírus dividido, antígenos de subunidade, vírus inteiro química ou diferentemente inativado.
5. Preparação de vírus da influenza inativado de acordo com a
20 reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a preparação de antígeno de influenza é uma preparação de antígeno de vírus dividido.
6. Preparação de vírus da influenza inativado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de compreender hemaglutinina de cepas A e B.
- 25 7. Preparação de vírus da influenza inativado de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de ser uma preparação de vírus da influenza trivalente.
8. Preparação de vírus da influenza inativado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de

compreender HA de influenza de cepa B estabilizada.

9. Vacina de influenza, caracterizada pelo fato de compreender a preparação de vírus da influenza como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 8.

5 10. Vacina de influenza de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a concentração de antígeno de hemaglutinina para a ou cada cepa de influenza é de 1-1.000 µg por mL, conforme medida por um ensaio de SRD.

10 11. Vacina de influenza de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente uma emulsão óleo-em-água.

12. Vacina de influenza de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um adjuvante.

15 13. Vacina de influenza de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito adjuvante é selecionado do grupo que consiste em: um derivado de lipídeo A atóxico, uma saponina ou derivado da mesma, uma combinação de um derivado de lipídeo A atóxico e uma saponina ou derivado do mesmo em uma emulsão óleo-em-água.

20 14. Vacina de influenza de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o dito derivado de lipídeo A atóxico é 3D-MPL.

15. Vacina de influenza de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que 3D-MPL está na forma de uma emulsão com um tamanho de partícula pequeno inferior a 0,2 µm de diâmetro.

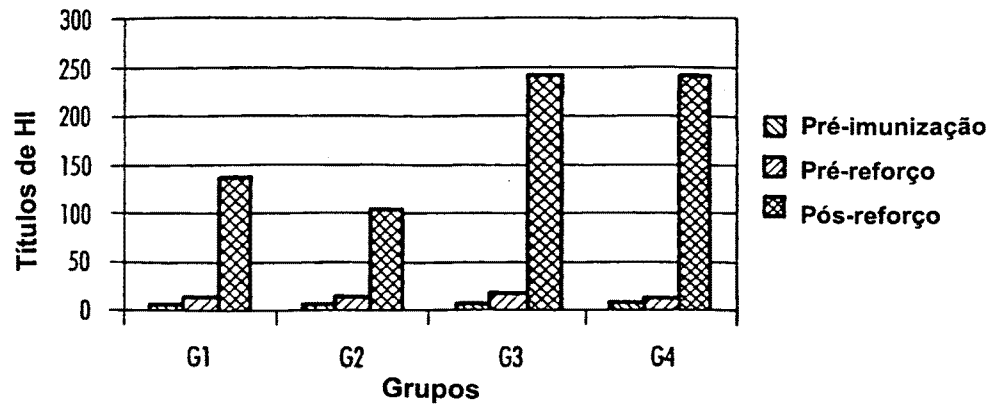
25 16. Método para a preparação de um antígeno de hemaglutinina estável, caracterizado pelo fato de compreender a purificação do antígeno na presença de α-tocoferol ou de um derivado do mesmo tal como succinato de α-tocoferol.

17. Uso de α -tocoferol ou succinato, caracterizado pelo fato de ser como um estabilizador de hemaglutinina na manufatura de uma vacina de influenza.

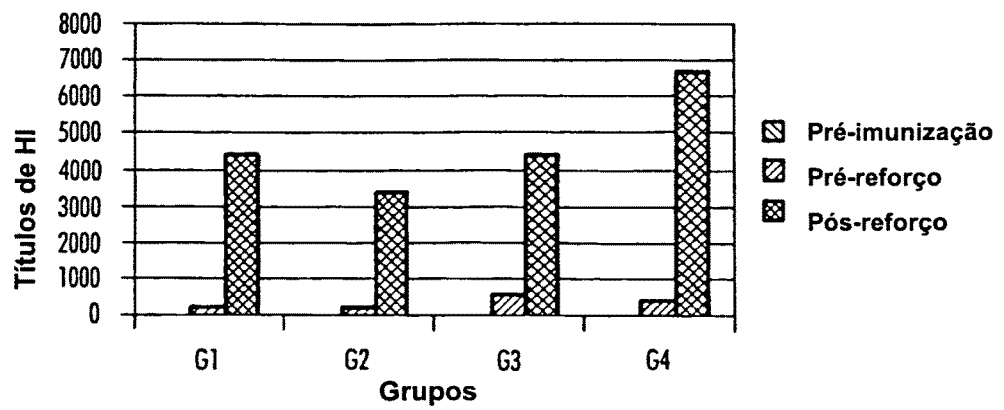
5 18. Vacina de influenza de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 15, caracterizada pelo fato de que é para uso em medicina.

Fig. 1

Anti A/New Caledonia (H1N1)



Anti A/Panama (H3N2)



Anti B/Johannesburg

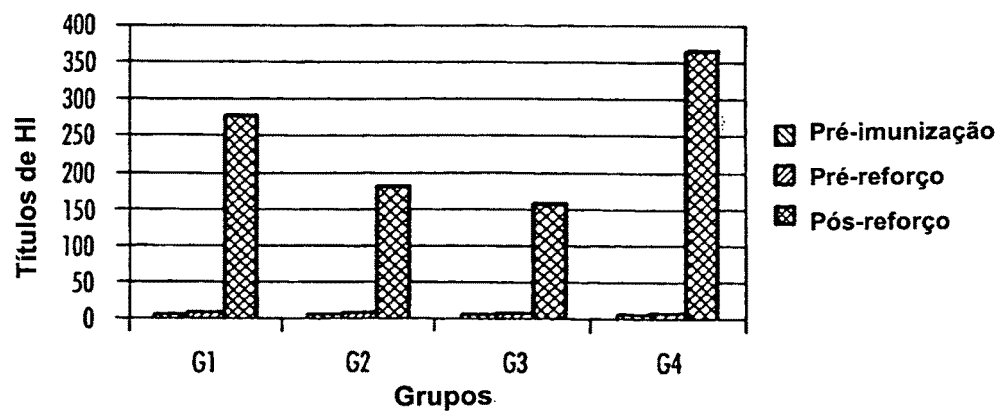


Fig. 2

Grupo 1: 2 Vacinações iniciais IN;

Tiomersal + Ag

Grupo 2: 2 Vacinações iniciais IN;

redução em Tiomersal

Grupo 3: 1 Vacinação inicial IN;

redução em Tiomersal

Grupo 4: 2 Vacinações iniciais IN;

redução em Tiomersal

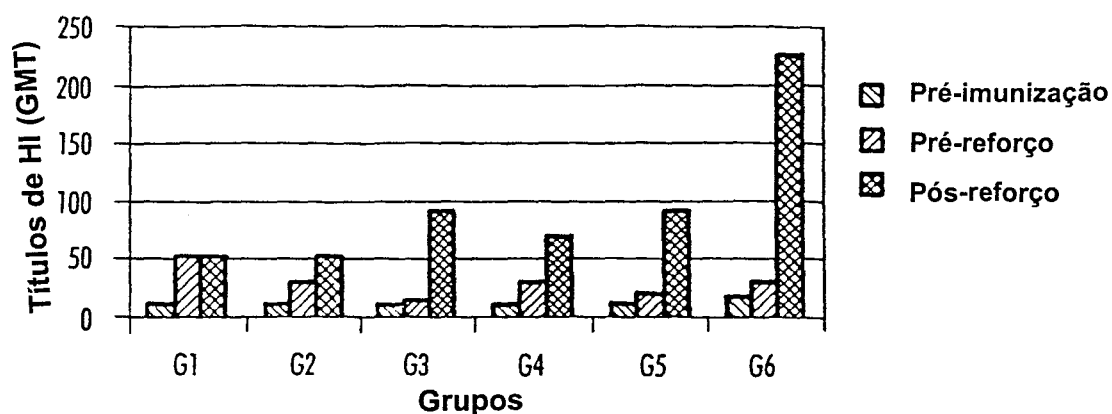
Grupo 5: 1 Vacinação inicial IN;

redução em Tiomersal

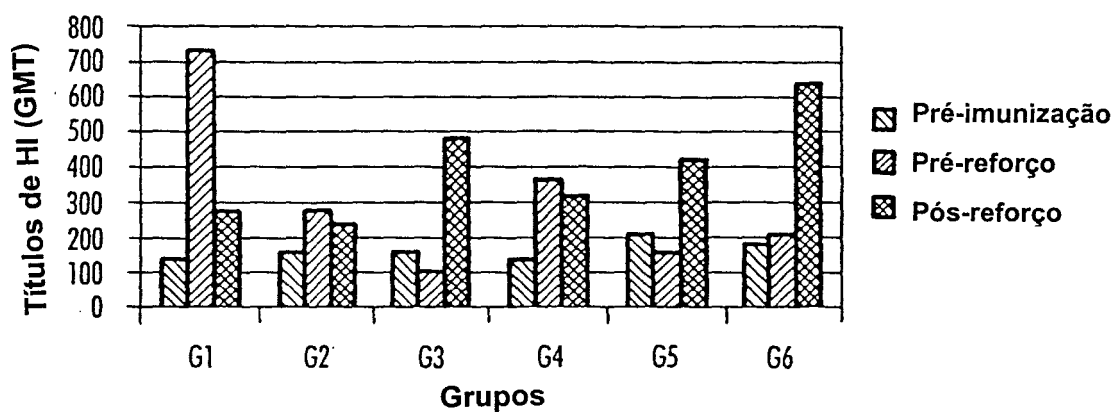
Grupo 6: 2 Vacinações iniciais IN;

redução em Tiomersal

Anti A/New Caledonia H1N1



Anti A/Panama H3N2



Anti B/Johannesburg

