



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

(21) **PI0618359-0 A2**

(22) Data de Depósito: 07/11/2006
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/29 2006.01
C07K 14/02 2006.01

(54) Título: **FABRICAÇÃO DE VACINAS QUE CONTÊM ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE DO VÍRUS DA HEPATITE B E TENSOATIVO**

(30) Prioridade Unionista: 08/11/2005 GB 0522765.7

(73) Titular(es): Novartis Vaccines and Diagnostics, Srl

(72) Inventor(es): Mario Contorni

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006003662 de 07/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/054820 de 18/05/2007

(57) Resumo: FABRICAÇÃO DE VACINAS QUE CONTEM ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE DO VÍRUS DA HEPATITE B E TENSOATIVO. Durante a preparação de HBsAg para uso em uma vacina combinada, normalmente se adiciona um detergente não-iônico após o HBsAg ter sido purificado. No entanto, a adição de detergentes após a purificação do HBsAg não ideal, na medida em que ela exige uma etapa de processamento separada durante a fabricação. Dessa forma, a invenção os utiliza durante a purificação do HBsAg.

**FABRICAÇÃO DE VACINAS QUE CONTÊM ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE DO
VÍRUS DA HEPATITE B E TENSOATIVO**

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

5

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção pertence ao campo da fabricação de vacinas combinadas, ou seja, vacinas que contêm imunógenos mistos de mais de um patógeno, de tal forma que a administração da vacina pode imunizar simultaneamente um indivíduo contra mais de um patógeno. Em particular, ela está relacionada ao uso de tensoativos durante a fabricação de vacinas combinadas.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Vacinas que contêm antígenos de mais de um organismo patogênico dentro de uma única dose são conhecidas como "multivalentes" ou vacinas de "combinação". Foram aprovadas várias vacinas combinadas para uso humano na Europa e nos Estados Unidos, incluindo vacinas trivalentes para proteção contra difteria, tétano e coqueluche (vacinas "DTP"), e vacinas trivalentes para proteção contra sarampo, caxumba e rubéola (vacinas "MMR").

Vacinas combinadas oferecem aos pacientes a vantagem de receberem um número reduzido de injeções, o que leva à vantagem clínica de um aumento da aceitação (por exemplo, veja o capítulo 29 da referência 1), particularmente para vacinação pediátrica. Ao mesmo tempo, no entanto, elas apresentam dificuldades de fabricação em consequência de fatores que incluem: incompatibilidade física e bioquímica entre antígenos e outros componentes; interferência imunológica; e estabilidade.

A inclusão de outros componentes além de antígenos em vacinas é necessária, mas pode trazer dificuldades. Tensoativos constituem um problema particular em vacinas combinadas, pois um antígeno pode exigir um tensoativo para uma atividade ótima, enquanto outro pode ser afetado negativamente pela presença do tensoativo. Além disso, a inclusão de tensoativos em vacinas pediátricas é preocupante em alguns grupos de pacientes, embora o tensoativo possa ser geralmente aceito como seguro.

De interesse particular no campo das vacinas são os tensoativos de ésteres de polioxietileno sorbitano, especialmente as espécies de polissorbato (também conhecido como "Tween 20", ou monolaurato de polioxietileno sorbitano) e polissorbato 80 (também conhecido como "Tween 80", ou monooleato de polioxietileno sorbitano). Polissorbato 20 é encontrado na vacina monovalente para hepatite A HAVRIX™, e polissorbato 80 é encontrado em vacinas combinadas como, por exemplo, TRIPEDIA™ e a série de vacinas INFANRIX™. Esses dois tensoativos também têm sido utilizados para estabilizar vacinas líquidas de rotavírus [2].

Os polissorbatos também têm sido usados na fabricação de vacinas combinadas que contêm antígeno de superfície da hepatite B ("HBsAg"), por exemplo, as referências 3 e 4 revelam um processo para a produção de uma vacina tetravalente D-T-P-HBsAg na qual a interferência com o componente fosfolipídico do HBsAg é evitada por adição de um tensoativo não-iônico como, por exemplo, Tween 20, Tween 80 ou Triton X-100. Os dados na Figure 2 das referências 3 e 4 (aqui, Fig. 1) mostram que o tensoativo é necessário

para a manutenção da antigenicidade de HBsAg, mas é menos importante para os outros componentes. A maior concentração de tensoativo testada foi de 10 µg/ml com 20 µg/ml de HBsAg, e essa concentração também gerou a melhor
5 antigenicidade.

No processo das referências 3 e 4, o detergente não-iônico é adicionado após o HBsAg ter sido purificado. No entanto, a adição de detergentes após a purificação de HBsAg não é ótima, na medida em que ela exige uma etapa de
10 processamento separada durante a fabricação, o que aumenta o tempo de processamento e também o risco de introdução de contaminação no HBsAg. Se for usado um componente contaminado na produção de uma vacina combinada, a perda eventual será maior do que quando se produzem vacinas
15 monovalentes; por exemplo, se um componente de HBsAg contaminado for misturado com um componente D-T-P limpo, toda a mistura de D-T-P-HBsAg deverá ser inutilizada, e não apenas o HBsAg.

Para vacinas combinadas que contêm tensoativos não-
20 iônicos, portanto, existe ainda a necessidade de um processo de fabricação no qual o tensoativo não tenha que ser adicionado como um componente separado durante o processo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

25 Ao invés de adicionar tensoativos não-iônicos aos antígenos após eles terem sido purificados [3,4], a invenção os utiliza durante a purificação do antígeno. Dessa forma, o tensoativo pode efetuar sua função na vacina combinada final, mas o risco de contaminação (e, portanto,
30 também o risco de perda de toda a vacina combinada após ela

ter sido preparada) é reduzido.

Dessa forma, a invenção fornece um processo para a preparação de uma vacina combinada, em que a vacina compreende: (i) um tensoativo não-iônico, (ii) um antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV), e (iii) um antígeno de pelo menos um patógeno não-HBV, e em que o processo compreende: (i) purificação do antígeno de superfície do HBV de células de levedura recombinantes, em que a purificação inclui uma etapa na qual as células de levedura são rompidas na presença do tensoativo não-iônico, para gerar um componente de HBsAg purificado; e (ii) combinação do componente de HBsAg purificado com pelo menos um antígeno adicional de um patógeno diferente do HBV, para gerar a vacina combinada.

Para evitar as dificuldades de contaminação descritas acima, o processo não envolve uma etapa de adição do tensoativo não-iônico como um componente separado após a purificação do HBsAg. É possível que o tensoativo (ou outros tensoativos, iônicos ou não-iônicos) esteja presente nos outros componentes antigênicos com os quais o HBsAg é combinado para gerar a vacina combinada, mas é evitada a adição do tensoativo como um componente separado por si próprio. Dessa forma, o tensoativo não é adicionado como um componente separado ao componente de HBsAg purificado, e não é adicionado durante a combinação dos antígenos.

A invenção também fornece um processo para a preparação de uma vacina combinada, em que a vacina compreende: (i) um tensoativo não-iônico, (ii) um antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV), e (iii) um antígeno de pelo menos um patógeno não-HBV, e em que o

processo compreende a etapa de combinação de um antígeno de superfície do HBV purificado com pelo menos um antígeno adicional de um patógeno diferente do HBV, para gerar a vacina combinada, em que o antígeno de superfície do HBV purificado foi preparado por um processo em que células de levedura recombinantes que expressam HBsAg são rompidas na presença do tensoativo não-iônico. Novamente, a adição separada do tensoativo é evitada.

A invenção também fornece uma composição imunogênica que compreende: (i) um tensoativo não-iônico, (ii) um antígeno de superfície do vírus da (HBV), e (iii) um antígeno de pelo menos um patógeno não-HBV, em que o antígeno de superfície do HBV foi preparado por um processo em que células de levedura recombinantes que expressam HBsAg foram rompidas na presença do tensoativo não-iônico. Novamente, o HBsAg foi preparado evitando-se a adição separada do tensoativo. Esse produto pode ser distinguido de produtos nos quais o HBsAg foi preparado por um processo diferente porque o tensoativo não-iônico usado durante a purificação pode ser retido dentro de uma partícula de HBsAg.

O tensoativo não-iônico

A invenção pode utilizar diversos tensoativos não-iônicos [5], e particularmente aqueles encontrados em formulações de vacinas. Preferem-se tensoativos orgânicos. Esses são tipicamente o produto de reação de um óxido de alquilenos (por exemplo, óxido de etileno) com um álcool graxo, ácido graxo, alquilfenol, alquilamina ou outro composto apropriado que possua pelo menos um átomo de hidrogênio ativo. Para a maioria dos tensoativos, os

alcoóis, aminas e ácidos mais comuns possuem um comprimento da cadeia de carbono na faixa de C₈-C₁₈. Os alquilfenóis mais comuns são nonilfenol e octilfenol. Tensoativos que contêm resíduos de poli(oxietileno) são particularmente
5 preferidos.

Por exemplo, a invenção pode ser usada com tensoativos que incluem, sem limitação: os tensoativos de ésteres de polioxietileno sorbitano (normalmente denominados Tweens), especialmente polissorbato 20 e polissorbato 80;
10 copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) e/ou óxido de butileno (BO), vendidos sob o nome comercial DOWFAXTM, por exemplo, copolímeros lineares em bloco EO/PO; octoxinóis, que podem variar em termos de número de grupos etóxi (óxi-1,2-etanodiil) de repetição,
15 com octoxinol-9 (Triton X-100 ou t-octilfenoxipolietoxietanol) sendo de particular interesse; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); éteres graxos de polioxietileno de lauril, cetil, estearil e oleil alcoóis (conhecidos como tensoativos Brij), por exemplo,
20 monolauril éter de trietilenoglicol (Brij 30); e ésteres de sorbitano (normalmente denominados SPANs), por exemplo, trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaurato de sorbitano.

A invenção é particularmente adequada para uso com
25 polissorbato 20. Esse tensoativo tem um perfil de segurança estabelecido para administração a seres humanos, incluindo dentro de vacinas.

Tensoativos podem ser classificados por seu "HLB" (equilíbrio hidrófilo/lipófilo). Tensoativos preferidos da
30 invenção possuem um HLB de pelo menos 10, preferivelmente

pelo menos 15 e, mais preferivelmente, pelo menos 16.

O tensoativo não-iônico é um componente de composições da invenção. Para evitar a administração de doses grandes do tensoativo a um paciente, prefere-se que a concentração do tensoativo na composição seja de, no máximo, 30 µg/ml, por exemplo, ≤ 25 µg/ml, ≤ 20 µg /ml, ≤ 15 µg/ml, ≤ 10 µg /ml, ≤ 5 µg/ml etc. Prefere-se uma concentração ≤ 10 µg/ml.

Como alternativa à especificação de tensoativo, prefere-se que a quantidade do tensoativo na composição seja menor do que 50 µg (por exemplo, ≤ 40 µg, ≤ 30 µg, ≤ 25 µg, ≤ 20 µg, ≤ 15 g, ≤ 10 µg etc.) para cada 100 µg de HBsAg. Da mesma forma, as referências 3 e 4 sugerem uma proporção de massa de tensoativo:HBsAg de menos de 50%. Prefere-se menos de 25 µg do tensoativo por 100 µg de HBsAg.

Como será mencionado com mais detalhe abaixo, processos da invenção preferidos utilizam um componente pré-misturado que inclui toxóides diftéricos e tetânicos. Esse componente de D-T é, preferência, substancialmente livre de tensoativos não-iônicos e, em particular, é livre de polissorbatos 20 e 80. Do mesmo modo, um componente pré-misturado de D-T-Pw é livre de tensoativos não-iônicos, por exemplo, polissorbatos 20 e 80.

O antígeno de superfície do vírus da hepatite B

O vírus da hepatite B (HBV) é um dos agentes conhecidos que causam hepatite viral. O vírion do HBV consiste em um núcleo interno circundado por um revestimento externo de proteína ou capsídeo, e o núcleo viral contém o genoma do DNA viral. O principal componente do capsídeo é uma proteína conhecida como antígeno de

superfície do HBV ou, mais comumente, "HBsAg", que é tipicamente um polipeptídeo de 226 aminoácidos com um peso molecular de ~24 kDa. Todas as vacinas para hepatite B existentes contêm HBsAg, e, quando esse antígeno é administrado a um paciente normal, ele estimula a produção de anticorpos anti-HBsAg que protegem contra a infecção pelo HBV.

Para a fabricação de vacinas, o HBsAg pode ser feito de duas formas. O primeiro método envolve a purificação do antígeno em forma particulada do plasma de portadores crônicos de hepatite B, na medida em que são sintetizadas grandes quantidades de HBsAg no fígado que são liberadas na corrente sanguínea durante uma infecção pelo HBV. A segunda forma envolve a expressão da proteína por métodos de DNA recombinante. O HBsAg para uso com o método da invenção é expresso de forma recombinante em células de levedura. Leveduras adequadas incluem hospedeiros de *Saccharomyces* (como, por exemplo, *S. cerevisiae*) ou *Hanensula* (como, por exemplo, *H. polimorpha*).

Diferentemente do HBsAg nativo (ou seja, como no produto purificado do plasma), o HBsAg expresso por leveduras é geralmente não glicosilado, e essa é a forma mais preferida de HBsAg para uso com a invenção. O HBsAg expresso por leveduras é altamente imunogênico, e pode ser preparado sem o risco contaminação de produtos sanguíneos.

O HBsAg estará geralmente na forma de partículas substancialmente esféricas (diâmetro médio de cerca de 20 nm), que inclui uma matriz lipídica que compreende fosfolipídeos. Partículas de HBsAg expresso em leveduras podem incluir fosfatidilinositol, que não é encontrado em

vírions do HBV natural. As partículas também podem incluir uma quantidade atóxica de LPS a fim de estimular o sistema imunológico [6].

O HBsAg é preferivelmente de HBV do subtipo adw2.

5 Muitos métodos para a purificação de HBsAg são conhecidos na técnica (por exemplo, veja as referências 7-33). Esses métodos são revelados para uso na produção de preparações monovalentes de HBsAg, mas, diferentemente do método revelados nas referências 3 e 4, nenhum deles está
10 relacionado à purificação de HBsAg especificamente para uso em vacinas combinadas. Qualquer um desses e de outros processos pode ser usado, desde que o processo seja adequado para a purificação do antígeno após a expressão em células de leveduras recombinantes, em que a purificação
15 inclui uma etapa na qual as células de levedura são rompidas na presença do tensoativo não-iônico.

Um método preferido para a purificação do HBsAg envolve, após ruptura das células: ultrafiltração, cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia por
20 troca aniônica; ultracentrifugação; dessalinização e filtração estéril. Os lisados podem ser precipitados após a ruptura das células (por exemplo, com o uso de um polietileno glicol), deixando o HBsAg em solução, pronto para ultrafiltração.

25 Após purificação, o HBsAg pode ser submetido à diálise (por exemplo, com cisteína), que pode ser usada para remover quaisquer conservantes mercuriais como, por exemplo, timerosal, que possam ter sido usados durante a preparação do HBsAg [30,34].

30 As quantidades de HBsAg são tipicamente expressas em

microgramas, e uma quantidade típica de HBsAg por dose de vacina é de 10 µg.

Além da seqüência "S", um antígeno de superfície pode incluir toda ou parte de uma seqüência pré-S, por exemplo,
5 toda ou parte de uma seqüência pré-S1 e/ou pré-S2.

Os antígenos não-HBV

As composições imunogênicas da invenção incluem pelo menos um antígeno protetor de pelo menos um patógeno não-HBV. Os patógenos diferentes do HBV podem ser virais e/ou
10 bacterianos.

Patógenos virais típicos incluem, sem limitação: poliovírus; vírus da hepatite A; vírus influenza; vírus do sarampo; vírus da caxumba; vírus da rubéola; e vírus da varicela zoster.

15 Patógenos bacterianos típicos incluem, sem limitação: *Corynebacterium diphtheriae*; *Clostridium tetani*; *Bordetella pertussis*; *Haemophilus influenzae*, incluindo o tipo b e cepas não tipáveis; *Neisseria meningitidis*, incluindo sorogrupos A, B, C, W135 e/ou Y; *Streptococcus pneumoniae*,
20 incluindo os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F; e *Moraxella catarrhalis*.

Corynebacterium diphtheriae causa a difteria. A toxina diftérica pode ser tratada (por exemplo, com o uso de formalina ou formaldeído) para remover a toxicidade,
25 retendo a habilidade para induzir anticorpos antitoxina específicos após a injeção. Esses toxóides diftéricos são usados em vacinas contra difteria, e são revelados com mais detalhe no capítulo 13 da referência 1. Toxóides diftéricos preferidos são aqueles preparados por tratamento com
30 formaldeído. O toxóide diftérico pode ser obtido por

crescimento de *C. diphtheriae* em meio de crescimento (por exemplo, meio de Fenton ou meio de Linggoud e Fenton), que pode ser suplementado com extrato bovino, seguido por tratamento com formaldeído, ultrafiltração e precipitação.

5 O material com toxóide pode então ser tratado por um processo que compreende filtração estéril e/ou diálise.

O *Clostridium tetani* causa o tétano. A toxina tetânica pode ser tratada para gerar um toxóide protetor. Os toxóides são usados em vacinas contra o tétano, e são
10 revelados com mais detalhes no capítulo 27 da referência 1. Toxóides tetânicos preferidos são aqueles preparados por tratamento com formaldeído. O toxóide tetânico pode ser obtido por crescimento de *C. tetani* em meio de crescimento (por exemplo, um meio de Latham derivado de caseína
15 bovina), seguido por tratamento com formaldeído, ultrafiltração e precipitação. O material pode então ser tratado por um processo que compreende filtração estéril e/ou diálise.

A *Bordetella pertussis* causa a coqueluche. Os
20 antígenos de pertussis em vacinas são celulares (célula inteira, na forma de células inativadas de *B. pertussis*, wP') ou acelulares ("aP"). A preparação de antígenos celulares de pertussis está bem documentada [por exemplo, veja o capítulo 21 da referência 1], por exemplo, ele pode
25 ser obtido por inativação por calor de cultura de fase I de *B. pertussis*. Quando forem usados antígenos acelulares, são incluídos um, dois ou (preferivelmente) três dos seguintes antígenos: (1) toxina de pertussis detoxificada (toxóide de pertussis ou "PT"), (2) hemaglutinina filamentosa ("FHA"),
30 (3); pertactina (também conhecido coma a "proteína da

membrana externa de 69 quilodáltons"). Esses três antígenos são preparados preferivelmente por isolamento de cultura de *B. pertussis* desenvolvida em meio líquido modificado de Stainer-Scholte. PT e FHA podem ser isolados do caldo de fermentação (por exemplo, por adsorção em gel de hidroxapatita), enquanto pertactina pode ser extraída das células por tratamento com calor e floculação (por exemplo, com o uso de cloreto de bário). Os antígenos podem ser purificados em etapas sucessivas de cromatografia e/ou precipitação. PT e FHA podem ser purificados por cromatografia hidrofóbica, cromatografia por afinidade e cromatografia por exclusão de tamanho. Pertactina pode ser purificada por cromatografia por troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por exclusão de tamanho. FHA e pertactina podem ser tratados com formaldeído antes de serem usados de acordo com a invenção. PT é preferivelmente detoxificado por tratamento com formaldeído e/ou glutaraldeído. Como alternativa a esse procedimento de detoxificação química, o PT pode ser um PT mutante no qual a atividade enzimática foi reduzida por mutagênese [35], mas a detoxificação por tratamento químico é preferida.

O *Haemophilus influenzae* do tipo b ("Hib") causa meningite bacteriana. Vacinas contra o Hib se baseiam tipicamente no antígeno do sacarídeo capsular [por exemplo, veja o capítulo 14 da referência 1], cuja preparação é bem documentada [por exemplo, referências 36 a 45]. O sacarídeo de Hib é conjugado a uma proteína transportadora, a fim de aumentar sua imunogenicidade, especialmente em crianças. Proteínas transportadoras típicas são toxóide tetânico,

toxóide diftérico, o derivado CRM197 do toxóide diftérico, a proteína D de *H. influenzae*, e um complexo protéico da membrana externa do meningococo do sorogrupo B. O toxóide tetânico é o veículo preferido, como usado no produto
5 normalmente denominado "PRP-T". PRP-T pode ser feito por ativação de um polissacarídeo capsular do Hib com o uso de brometo de cianogênio, acoplamento do sacarídeo ativado a um vinculador de ácido adípico (como, por exemplo, (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), tipicamente o sal
10 de sal de cloridrato), e depois reação da entidade vinculador-sacarídeo com uma proteína transportadora de toxóide tetânico. A porção sacarídica do conjugado pode compreender fosfato de polirribosilribitol (PRP) de comprimento total preparado por bactérias Hib e/ou
15 fragmentos de PRP de comprimento total. Podem ser usados conjugados com uma proporção de sacarídeo:proteína (p/p) entre 1:5 (ou seja, proteína em excesso) e 5:1 (ou seja, sacarídeo em excesso), por exemplo, proporções entre 1:2 e 5:1 e proporções entre 1:1,25 e 12:5. Em vacinas
20 preferidas, no entanto, a proporção de peso de sacarídeo para proteína transportadora é entre 1:2,5 e 1:3,5. Em vacinas nas quais está presente o toxóide tetânico tanto como antígeno quanto como proteína transportadora, a proporção de peso de sacarídeo para proteína transportadora
25 no conjugado pode ser entre 1:0,3 e 1:2 [46]. A administração do conjugado de Hib preferivelmente resulta em uma concentração de anticorpo anti-PRP $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ e, mais preferivelmente, $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, e esses são os limiares da resposta-padrão.

30 A *Neisseria meningitidis* causa meningite bacteriana.

Com base no polissacarídeo capsular do organismo, foram identificados vários sorogrupos de *N. meningitidis*, incluindo os sorogrupos A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y e Z. Os sorogrupos mais associados à doença são A, B, C, W135 e Y. As vacinas atuais contra os sorogrupos A, C, W135 e Y se baseiam nos antígenos sacarídicos capsulares, mas essa abordagem não é adequada ao sorotipo B e, portanto, em seu lugar são usados antígenos protéicos e vesículas de membrana externa. Os sacarídeos capsulares são conjugados a proteínas transportadoras a fim de aumentar a imunogenicidade. Proteínas transportadoras típicas são o toxóide tetânico, o toxóide diftérico, o derivado CRM197 do toxóide diftérico, e a proteína D de *H. influenzae*. A porção sacarídica do conjugado pode compreender sacarídeo de comprimento total preparado a partir de meningococos e/ou fragmentos destes. Os sacarídeos do sorogrupo C podem ser preparados por cepas OAc+ ou OAc-. Para os sacarídeos do sorogrupo A, preferivelmente pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais) dos resíduos de manosamina são O-acetilados na posição C-3. Podem ser usados conjugados meningocócicos com uma proporção de sacarídeo:proteína (p/p) entre 1:10 (ou seja, proteína em excesso) e 10:1 (ou seja, sacarídeo em excesso), por exemplo, proporções entre 1:5 e 5:1, entre 1:2,5 e 2,5:1 ou entre 1:1,25 e 1,25:1. A administração de um conjugado preferivelmente resulta em um aumento na titulação de um ensaio sérico bactericida (SBA) para o sorogrupo relevante de pelo menos 4 vezes e, preferivelmente, pelo menos 8 vezes. As titulações de SBA podem ser medidas com o uso de complemento de filhote de

coelho ou complemento humano [47].

O *Streptococcus pneumoniae* causa meningite bacteriana. Como ocorre para Hib e meningococo, as vacinas existentes se baseiam em sacarídeos capsulares. Prefere-se incluir 5 sacarídeos de mais de um sorotipo de *S. pneumoniae* e, particularmente, pelo menos os sorotipos 6B, 14, 19F e 23F. Sorotipos adicionais são preferivelmente selecionados de: 1, 3, 4, 5, 7F, 9V e 18C. Por exemplo, misturas de polissacarídeos de 23 sorotipos diferentes são amplamente 10 usadas, bem como vacinas de conjugados com polissacarídeos entre 5 e 11 sorotipos diferentes [48]. Por exemplo, PrevNar™ [49] contém antígenos conjugados de sete sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F). Os sacarídeos são conjugados preferivelmente a proteínas transportadoras 15 [por exemplo, referências 50 a 52]. Proteínas transportadoras típicas são o toxóide tetânico, o toxóide diftérico, o derivado CRM197 de toxóide diftérico e a proteína D de *H. influenzae*. Os sacarídeos no produto PrevNar™ são conjugados individualmente a CRM197 por 20 aminação redutora, com 2 µg de cada sacarídeo por dose de 0,5 ml (4 µg de sorotipo 6B). Como alternativa ao uso de antígenos sacarídicos de pneumococo, a composição pode incluir um ou mais antígenos polipeptídicos. São disponíveis seqüências genômicas para várias cepas de 25 pneumococo [53,54], e podem ser submetidas à vacinologia reversa [55-58] para a identificação de antígenos polipeptídicos adequados [59,60]. Por exemplo, a composição pode incluir um ou mais dos seguintes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, 30 Sp128, Sp130 e Sp130, como definidos na referência 61. A

composição pode incluir mais de um (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13 ou 14) desses antígenos. Em algumas modalidades, a composição pode incluir antígenos tanto sacarídicos e polipeptídicos de pneumococo. Esses 5 podem ser usados em mistura simples ou o antígeno sacarídico pneumocócico pode ser conjugado a uma proteína pneumocócica. Proteínas transportadoras adequadas para essas modalidades incluem os antígenos protéicos pneumocócicos listados acima [61].

10 A *Moraxella catarrhalis* causa otite média e sinusite, e é uma causa ocasional de laringite. As vacinas estão atualmente sob investigação, como revisado na referência 62.

Como o HBV, o HAV causa hepatite. As vacinas contra o 15 HAV são reveladas no capítulo 15 da referência 1. Um componente de HAV preferido se baseia no vírus inativado, e a inativação pode ser obtida por tratamento com formalina. O vírus pode se desenvolver em fibroblastos diplóides pulmonares embriológicos humanos, por exemplo, células MRC- 20 5. Uma cepa preferida do HAV é HM175, embora CR326F também possa ser usada. As células podem crescer sob condições que permitam o crescimento viral. As células são lisadas, e a suspensão resultante pode ser purificada por ultrafiltração e cromatografia por permeação em gel.

25 O poliovírus causa a poliomielite. Em vez de usar vacina de poliovírus oral, a invenção utiliza vacina de poliovírus inativado (IPV), o que é revelado com mais detalhe no capítulo 24 da referência 1. Os poliovírus podem crescer em cultura de células, e uma cultura preferida 30 utiliza uma linhagem de células Vero, derivadas de rim de

macaco. Células Vero podem ser convenientemente microportadores cultivados. Após o crescimento, os vírions podem ser purificados com o uso de técnicas como ultrafiltração, diafiltração e cromatografia. Antes da administração aos pacientes, os poliovírus devem ser inativados, o que pode ser obtido por tratamento com formaldeído. A poliomielite pode ser causada por um de três tipos de poliovírus. Os três tipos são similares e causam sintomas idênticos, mas são antigenicamente muito diferentes, e a infecção por um tipo não protege contra a infecção por outros. Prefere-se, portanto, usar três antígenos de poliovírus na invenção: poliovírus do Tipo 1 (por exemplo, cepa Mahoney), poliovírus do Tipo 2 (por exemplo, cepa MEF-1) e poliovírus do Tipo 3 (por exemplo, cepa Saukett). Os vírus preferivelmente crescem, são purificados e inativados individualmente, e são então combinados para gerar uma mistura trivalente para uso com a invenção. As quantidades de IPV são tipicamente expressas na unidade "DU" (a "unidade de antígeno D" [63]).

Antígenos para proteção contra os vírus do sarampo, caxumba e rubéola são tipicamente vírus vivos, como encontrado em vacinas monovalentes e trivalentes ("MMR") conhecidas. As vacinas contra o vírus do sarampo são descritas com mais detalhe no capítulo 19 da referência 1. As vacinas contra o vírus da caxumba são descritas com mais detalhe no capítulo 20 da referência 1. As vacinas contra o vírus da rubéola são descritas com mais detalhe no capítulo 26 da referência 1. As cepas típicas do vírus do sarampo incluem: Moraten; Connaught; Schwarz; Edmonston-Zagreb; CAM-70; AIK-C; TD97; Leningrad-16; Shanghai-191; etc. As

cepas Schwarz e Moraten são as mais comuns para uso nos EUA e na Europa. As cepas típicas do vírus da caxumba incluem: Jeryl Lynn; RIT 4385; Urabe; Hoshino; Rubini; Leningrad-3; Leningrad-Zagreb; Miyahara; Torii; NK M-46; S-12 etc. As
5 cepas Jeryl Lynn, RIT 4385, Urabe e Leningrad-Zagreb são as cepas mais comuns em todo o mundo. As cepas típicas do vírus da rubéola incluem: RA27/3; Matsuba; TCRB 19; Takahashi; Matsuura; TP-336 etc. A cepa RA27/3 é a mais comumente usada no mundo ocidental.

10 Os antígenos de VZV para proteção contra a varicela são tipicamente vírus vivos, com base na cepa Oka do vírus. As vacinas contra o VZV são descritas com mais detalhe no capítulo 28 da referência 1.

Os antígenos do vírus influenza são descritos com mais
15 detalhe nos capítulos 17 e 18 da referência 1. De um modo geral, as vacinas contra o vírus influenza podem se basear no vírus vivo ou no vírus inativado, e vacinas inativadas podem se basear no vírus inteiro, no vírus "dividido" ou em antígenos de superfície purificados (incluindo
20 hemaglutinina e neuraminidase). Os vírus usados para preparar as vacinas podem crescer em ovos ou em culturas de células. As cepas da vacina contra influenza mudam de estação para estação. No período atual interpandêmico, as vacinas tipicamente incluem duas cepas de influenza A (H1N1 e H3N2) e uma cepa de influenza B, e vacinas trivalentes
25 são típicas. A invenção também pode utilizar vírus de cepas pandêmicas (ou seja, cepas para as quais os que recebem a vacina e a população humana geral são imunologicamente virgens) como, por exemplo, as cepas dos subtipos H2, H5,
30 H7 ou H9 (em particular do vírus influenza A), e vacinas

para influenza para cepas pandêmicas podem ser monovalentes ou podem ser baseadas em uma vacina trivalente normal suplementada por uma cepa pandêmica. O vírus influenza pode ser uma cepa re-classificada e pode ter sido obtido por técnicas de genética reversa. O vírus pode ser atenuado. O vírus pode ser sensível à temperatura. O vírus pode ser adaptado ao frio.

Os componentes antigênicos desses patógenos para uso em vacinas são comumente denominados por nomes abreviados: "D" para toxóide diftérico; "T" para toxóide tetânico; "P" para antígenos de pertussis, com "Pa" sendo acelular e "Pw" sendo celular; "Hib" para sacarídeo capsular de *H. influenzae b*; "MenA", "MenB", "MenC", "MenW" e "MenY" para os respectivos sorogrupos meningocócicos; "IPV" para poliovírus inativado; e "Spn" para pneumococo.

Quando se combinam componentes antigênicos com HBsAg para a preparação de uma composição multivalente, os antígenos podem ser adicionados individualmente, ou podem ser pré-misturados antes de serem combinados com o HBsAg. Quando são usados antígenos D e T, prefere-se utilizar um componente pré-misturado de D-T. Esse componente bivalente pode ser usado nos processos da invenção; por exemplo, ele pode ser combinado com o HBsAg para fazer um componente trivalente D-T-HBV. Alternativamente, o componente de D-T pode ser combinado com antígenos adicionais diferentes de HBV (por exemplo, com antígenos acelulares de pertussis), e aquele componente pode então ser combinado com HBsAg etc. Quando são usados antígenos D, T e Pw, prefere-se utilizar um componente pré-misturado de D-T-Pw, e depois usar esse componente durante os processos da invenção.

Quando é incluído um adjuvante nas composições da invenção, ele também poderá ser adicionado em vários estágios. Tipicamente, os antígenos terão sido combinados com os adjuvantes, antes de serem usados nos processos da invenção (por exemplo, uma mistura bivalente D-T terá sido adsorvida a um adjuvante(s) de sal de alumínio, antes de ser utilizada nos processos da invenção, o que pode ser convenientemente obtido preparando-se os toxóides separadamente, adsorvendo-se cada um deles separadamente ao adjuvante de hidróxido de alumínio, e depois misturando-se os dois toxóides adsorvidos (opcionalmente com um adjuvante adicional) para gerar o material para uso no processo da invenção), mas também é possível adicionar o adjuvante após os antígenos terem sido misturados, ou adicionar os antígenos a um adjuvante (por exemplo, começar com um adjuvante aquoso, depois adicionar os antígenos, individualmente ou pré-misturados). Como descrito abaixo, o componente de HBsAg é preferivelmente adsorvido a um adjuvante de fosfato de alumínio, antes de ser combinado aos componentes antigênicos não-HBV.

Composições da invenção preferidas incluem pelo menos antígenos D, T e P (veja as referências 3 e 4) além do HBsAg. Composições particularmente preferidas são as seguintes combinações:

- 25 - HBsAg, D, T.
- HBsAg, D, T, Pw.
- HBsAg, D, T, Pw, Hib.
- HBsAg, D, T, Pw, Hib, MenA, MenC.
- HBsAg, D, T, Pw, Hib, MenA, MenC, MenW 135.
- 30 - HBsAg, D, T, Pw, Hib, MenA, MenC, MenY.

- HBsAg, D, T, Pw, Hib, MenA, MenC, MenW135, MenY.
- HBsAg, D, T, Pa.
- HBsAg, D, T, Pa, Hib.
- HBsAg, D, T, Pa, poliovírus.
- 5 - HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib.
- HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC.
- HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC, MenA.
- HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC, MenY.
- HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC, MenW135.
- 10 - HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC, MenA,
MenW135, MenY.
- HBsAg, Hib.
- HBsAg, vírus da Hepatite A.

Essas composições podem consistir nos antígenos
 15 listados, ou podem ainda incluir antígenos de patógenos
 adicionais. Dessa forma, eles podem ser usados
 separadamente ou como componentes de vacinas adicionais.

Em algumas modalidades da invenção, a composição não é
 uma D-T-Pa-HBV-IPV pentavalente [30]. Dessa forma, a
 20 composição pode incluir um componente Pw e/ou pelo menos um
 conjugado.

Adjuvantes

Composições imunogênicas preferidas da invenção
 incluem um adjuvante, e esse adjuvante preferivelmente
 25 compreende um ou mais sais de alumínio e, particularmente,
 um adjuvante de fosfato de alumínio e/ou um adjuvante de
 hidróxido de alumínio.

Os componentes antigênicos usados nos processos da
 invenção preferivelmente incluem adjuvantes de alumínio
 30 antes de serem usados no processo, ou seja, eles são "pré-

misturados" ou "pré-adsorvidos" ao(s) adjuvante(s).

Em composições que compreendem HBsAg e um toxóide diftérico, o toxóide diftérico pode ser adsorvido em um adjuvante de hidróxido de alumínio.

5 Em composições que compreendem HBsAg e um toxóide tetânico, o toxóide tetânico pode ser adsorvido em um adjuvante de hidróxido de alumínio, mas isso não é necessário (por exemplo, adsorção entre 0-10% do toxóide tetânico total pode ser usada).

10 Em composições que compreendem HBsAg e um antígeno de pertussis de célula inteira, o antígeno wP é preferivelmente combinado a um adjuvante de hidróxido de alumínio e/ou a um adjuvante de fosfato de alumínio.

15 Em composições que compreendem HBsAg e antígeno(s) acelular(es) de pertussis, o(s) antígeno(s) de pertussis pode ser adsorvido em um ou mais adjuvantes de sal de alumínio, ou pode ser adicionado em um estado não adsorvido.

20 Quando pertactina estiver presente em uma composição, ela será preferivelmente adsorvida em um adjuvante de hidróxido de alumínio antes de ser usada no processo da invenção. PT e FHA podem ser adsorvidos em um adjuvante de hidróxido de alumínio ou em um de fosfato de alumínio, antes de serem usados no processo da invenção. Em
25 modalidades preferidas, PT, FHA e pertactina são pré-adsorvidos separadamente ao hidróxido de alumínio, antes de serem usados no processo da invenção.

30 Em composições que compreendem HBsAg e antígenos de Hib, o conjugado de Hib pode ser não adsorvido, mas ele é preferivelmente adsorvido a um adjuvante de fosfato de

alumínio [64]. A adsorção desta é particularmente útil em vacinas que compreendem antígenos D-T-Pw-Hib-HBsAg. Outros antígenos conjugados (por exemplo, de meningococo e de pneumococo) podem ser adsorvidos de modo similar a um sal de alumínio (por exemplo, fosfato) ou podem ser não adsorvidos [65].

Antígenos de IPV são tipicamente não adsorvidos a qualquer adjuvante antes de serem usados em um processo da invenção, mas podem se tornar adsorvidos em adjuvante(s) de alumínio que se origina com outros componentes.

O HBsAg na composição pode ser adsorvido em fosfato de alumínio com a utilização dos métodos descritos na referência 66. A adsorção ao fosfato de alumínio contrasta com o produto conhecido ENGERIX-B™ (no qual o HBsAg é adsorvido ao hidróxido de alumínio), mas é igual à que ocorre nos produtos HEPACCINE™ e RECOMBIVAX™. Como mencionado na referência 67, o fosfato de alumínio pode ser um adjuvante melhor para HBsAg do que o hidróxido de alumínio. Embora o HBsAg possa ser adsorvido a um adjuvante de hidróxido de alumínio na vacina final (como no produto conhecido ENGERIX-B™) ou possa permanecer não adsorvido, ele geralmente será adsorvido a um adjuvante de fosfato de alumínio. Além disso, ele é preferivelmente pré-adsorvido ao fosfato de alumínio, antes de ser usado no processo da invenção.

Quando um processo da invenção utilizar um componente no qual os toxóides diftéricos e tetânicos tenham sido misturados antes de serem combinados com o HBsAg, essa mistura D-T preferivelmente conterá um adjuvante de hidróxido de alumínio, ao qual os antígenos D e T estão

adsorvidos.

Quando um processo da invenção utilizar um componente no qual toxóide diftérico, toxóide tetânico e antígeno de pertussis de célula inteira tenham sido misturados antes de serem combinados com o HBsAg, essa mistura D-T-Pw preferivelmente conterá tanto um adjuvante de hidróxido de alumínio, ao qual os antígenos D e T estão adsorvidos, quanto um adjuvante de fosfato de alumínio.

Adjuvantes de alumínio em uso atualmente são tipicamente denominados adjuvantes de "hidróxido de alumínio" ou de "fosfato de alumínio". Esses são nomes de conveniência, no entanto, uma vez que nenhum deles é uma descrição precisa do verdadeiro composto químico presente (por exemplo, veja o capítulo 9 da referência 68). A invenção pode usar qualquer um dos sais de "hidróxido" ou "fosfato" que são de uso geral como adjuvantes.

Os adjuvantes conhecidos como "hidróxido de alumínio" são tipicamente sais de oxihidróxido de alumínio, que são normalmente pelo menos parcialmente cristalinos. O oxihidróxido de alumínio, que pode ser representado pela fórmula $AlO(OH)$, pode ser distinguido de outros compostos de alumínio, por exemplo, hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$), por espectroscopia infravermelha (IR), em particular pela presença de uma banda de adsorção a 1.070 cm^{-1} e um forte ressalto a $3.090\text{-}3.100\text{ cm}^{-1}$ (capítulo 9 da referência 68).

Os adjuvantes conhecidos como "fosfato de alumínio" são tipicamente hidroxifosfatos de alumínio, que freqüentemente também contêm uma pequena quantidade de sulfato. Eles podem ser obtidos por precipitação, e as condições de reação e as concentrações durante a

precipitação influenciam o grau de substituição de hidroxil por fosfato no sal. Os hidroxifosfatos geralmente possuem uma proporção molar de PO_4/Al entre 0,3 e 0,99. Os hidroxifosfatos podem ser distinguidos do AlPO_4 exato pela
5 presença de grupos hidroxil. Por exemplo, uma banda de espectro IR a 3.164 cm^{-1} (por exemplo, quando aquecido até 200°C) indica a presença de grupos hidroxil estruturais (capítulo 9 da referência 68).

A proporção molar de $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de um adjuvante de
10 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 uma
15 proporção molar de PO_4/Al entre 0,84 e 0,92, incluída em 0,6 mg de Al^{3+}/ml . O fosfato de alumínio será geralmente particulado. Diâmetros típicos das partículas estão na faixa de 0,5 - 20 μm (por exemplo, cerca de 5 - 10 μm) após qualquer adsorção de antígeno.

20 O PZC do fosfato de alumínio está inversamente relacionado ao grau de substituição de hidroxil por fosfato, e esse grau de substituição pode variar, dependendo das condições de reação e da concentração de reagentes usadas para a preparação do sal por precipitação.
25 O PZC também é alterado por mudança da concentração de íons fosfato livres em solução (mais fosfato = PZC mais ácido) ou por adição de um tampão como, por exemplo, um tampão de histidina (torna o PZC mais básico). Fosfatos de alumínio usados de acordo com a invenção terão geralmente um PZC
30 entre 4,0 e 7,0, mais preferivelmente entre 5,0 e 6,5, por

exemplo, cerca de 5,7.

Uma solução de fosfato de alumínio usada para preparar uma composição da invenção pode conter um tampão (por exemplo, um tampão de fosfato ou de histidina ou um tampão 5 Tris), mas isso nem sempre é necessário. A solução de fosfato de alumínio é preferivelmente estéril e livre de pirogênicos. A solução de fosfato de alumínio pode incluir íons livres de fosfato aquoso, por exemplo, presentes em uma concentração entre 1,0 e 20 mM, preferivelmente entre 5 10 e 15 mM e, mais preferivelmente, cerca de 10 mM. A solução de fosfato de alumínio também pode compreender cloreto de sódio. A concentração de cloreto de sódio está preferivelmente na faixa de 0,1 a 100 mg/ml (por exemplo, 0,5-50 mg/ml, 1-20 mg/ml, 2-10 mg/ml) e, mais 15 preferivelmente, cerca de 3 ± 1 mg/ml. A presença de NaCl facilita a medida correta do pH, antes da adsorção de antígenos.

Em algumas modalidades, a invenção pode excluir composições que compreendem uma emulsão óleo-em-água que 20 contêm uma mistura de polissorbato 80, Span 85 e esqualeno [69]. Em algumas modalidades, a invenção pode excluir composições que compreendem uma mistura de um óleo, um α -tocoferol e polissorbato 80 [70]. Em algumas modalidades, a invenção pode excluir composições que compreendem um 25 adjuvante de saponina (como, por exemplo, QS21) e um tensoativo não-iônico (como, por exemplo, polissorbato 40, 60 ou 80). Em algumas modalidades, a invenção pode excluir composições que compreendem um adjuvante de saponina, um óleo metabolizável e um tensoativo não-iônico [71]. Em 30 algumas modalidades, a invenção pode excluir composições

que compreendem um adjuvante de saponina, uma emulsão óleo-em-água e um esterol [72]. Em algumas modalidades, a invenção pode excluir composições que compreendem 3d-MPL, QS21 e uma emulsão óleo-em-água [73].

5 **Combinação de HBsAg purificado com antígenos adicionais**

Os processos da invenção incluem uma etapa na qual HBsAg purificado é combinado com pelo menos um antígeno de pelo menos um patógeno diferente do HBV.

Os antígenos podem ser combinados individualmente em série, ou podem ser pré-misturados e adicionados em conjunto. Por exemplo, uma vacina tetravalente de DTP-HBsAg pode ser feita por um processo que envolve a adição serial de HBsAg, antígenos D, T e P a um vaso, ou por pré-mistura de antígenos D, T e P, e depois combinando-se o HBsAg e a
10 mistura de DTP.
15

Componentes antigênicos podem ser combinados em qualquer ordem adequada.

Os antígenos dos patógenos diferentes do HBV podem compreender um tensoativo, o qual pode ser o mesmo ou diferente do tensoativo não-iônico usado durante a purificação do HBsAg. Os processos da invenção são particularmente úteis quando os outros componentes antigênicos compreenderem um tensoativo, na medida em que são evitadas múltiplas etapas separadas para a adição de
20 tensoativo. Preferem-se os processos nos quais um ou mais dos componentes diferentes de HBV compreendem polissorbato
25 80.

Quando forem incluídos toxóides diftéricos e tetânicos em uma composição da invenção, eles serão preferivelmente
30 pré-misturados, antes de serem combinados com o HBsAg.

Dessa forma, o processo da invenção envolve a combinação de um primeiro componente que compreende HBsAg, com um segundo componente que compreende antígenos D e T. Do mesmo modo, quando toxóide diftérico, toxóide tetânico e antígenos de pertussis de célula inteira forem incluídos em uma composição, eles serão preferivelmente pré-misturados e, assim, o processo da invenção envolve a combinação de um primeiro componente que compreende HBsAg com um segundo componente que compreende antígenos D, T e Pw.

10 Quando for usada uma mistura de D-T, a proporção de toxóide diftérico para toxóide tetânico nas vacinas da invenção será normalmente entre 2:1 e 3:1 (medida em unidades Lf), preferivelmente entre 2,4:1 e 2,6:1 e, mais preferivelmente, 2,5:1.

15 Quando foi incluído um adjuvante nas composições da invenção, ele também poderá ser adicionado em vários estágios. Tipicamente, os antígenos terão sido combinados com os adjuvantes antes de serem usados nos processos da invenção (por exemplo, uma mistura bivalente D-T terá sido
20 adsorvida ao(s) adjuvante(s) de sal de alumínio, antes de ser usada nos processos da invenção), mas também é possível adicionar o adjuvante após os antígenos terem sido misturados, ou adicionar os antígenos a um adjuvante (por exemplo, começar com um adjuvante aquoso e depois adicionar
25 os antígenos, tanto individualmente quanto pré-misturados). Como descrito acima, o componente de HBsAg pode ser adsorvido a um adjuvante de fosfato de alumínio, antes de ser combinado aos componentes antigênicos diferentes de HBV.

30 **A vacina combinada**

As composições da invenção podem compreender: (a) um componente antigênico; e (b) um componente não antigênico. O componente antigênico pode compreender ou consistir nos antígenos revelados acima. O componente não antigênico pode
5 incluir veículos, adjuvantes, excipientes, tampões etc., como descrito com mais detalhe acima. Esses componentes não antigênicos podem ter várias fontes. Eles podem estar presentes em um dos materiais de antígeno ou de adjuvante utilizados durante a fabricação, ou podem ser adicionados
10 separadamente daqueles componentes.

Composições preferidas da invenção incluem um ou mais veículos e/ou excipientes farmacêuticos.

Para controle da tonicidade, prefere-se incluir um sal como, por exemplo, um sal de sódio. Prefere-se o cloreto de
15 sódio (NaCl), que pode estar presente entre 1 e 20 mg/ml.

As composições terão geralmente uma osmolalidade entre 200 mOsm/kg e 400 mOsm/kg, preferivelmente entre 240-360 mOsm/kg, e estarão preferivelmente dentro da faixa de 280-320 mOsm/kg. A osmolalidade foi previamente relatada como
20 não tendo impacto sobre a dor causada pela vacinação [74], mas, todavia, prefere-se manter a osmolalidade nesse intervalo.

As composições da invenção podem incluir um ou mais tampões. Tampões típicos incluem: um tampão de fosfato; um
25 tampão Tris; um tampão de borato; um tampão de succinato; um tampão de histidina; ou um tampão de citrato. Os tampões tipicamente serão incluídos na faixa de 5-20 mM.

O pH de uma composição da invenção estará geralmente entre 5,0 e 7,5 e, mais tipicamente, entre 5,0 e 6,0 para
30 uma estabilidade ótima ou, quando estiver presente um

toxóide diftérico e/ou um toxóide tetânico, entre 6,0 e 7,0. Portanto, o processo da invenção pode incluir uma etapa de ajuste do pH do volume de vacina, antes da embalagem.

5 As composições da invenção são preferivelmente estéreis.

As composições da invenção são preferivelmente não pirogênicas, contendo, por exemplo, < 1 EU (unidade de endotoxina, uma medida-padrão) por dose e, preferivelmente,
10 < 0,1 EU por dose.

As composições da invenção preferivelmente não contêm glúten.

Em função da natureza adsorvida do HBsAg, o produto de vacina final pode ser uma suspensão com uma aparência
15 turva. Essa aparência significa que uma possível contaminação microbiana não será facilmente visível e, portanto, a vacina preferivelmente contém um agente antimicrobiano. Isso é particularmente importante quando a vacina for embalada em recipientes multidoses.
20 Antimicrobianos preferidos para inclusão são 2-fenoxietanol e timerosal. Prefere-se, no entanto, não utilizar conservantes mercuriais (por exemplo, timerosal) durante o processo da invenção. Dessa forma, entre 1 e todos os componentes usados no processo podem ser substancialmente
25 livres de conservante mercurial (particularmente um componente bivalente de D-T; um componente de IPV; um componente conjugado). No entanto, a presença de quantidades residuais pode ser inevitável caso um componente (particularmente HBsAg) tenha sido tratado
30 anteriormente com um conservante desse tipo. Por segurança,

no entanto, prefere-se que a composição final contenha menos de cerca de 25 ng/ml de mercúrio. Mais preferivelmente, o produto de vacina final não contém timerosal detectável. Isso geralmente pode ser obtido por
5 remoção do conservante mercurial de uma preparação de antígeno, antes de sua adição no processo da invenção, ou evitando-se o uso de timerosal durante a preparação dos componentes usados para a produção da composição.

Quando for usada uma mistura bivalente D-T durante um
10 processo da invenção, ela deverá ser livre de timerosal. Em algumas modalidades, a mistura D-T pode incluir 2-fenoxietanol, mas em outras ela é livre tanto de timerosal quanto de 2-fenoxietanol. Quando for usada uma mistura trivalente D-T-Pw durante um processo da invenção, ela
15 poderá ser livre de 2-fenoxietanol, mas poderá incluir timerosal.

Durante a fabricação, a diluição de componentes para gerar concentrações finais desejadas será realizada normalmente com WFI (água para injeção).

20 A concentração de fosfato de alumínio em uma composição da invenção, expressa em termos de Al^{3+} , é preferivelmente menor do que 5 mg/ml, por exemplo, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml etc.

A concentração de HBsAg em uma composição da invenção
25 é preferivelmente menor do que 60 μ g/ml, por exemplo, ≤ 55 μ g/ml, ≤ 50 μ g/ml, ≤ 45 μ g/ml, ≤ 40 μ g/ml etc. Uma concentração de cerca de 20 μ g/ml é típica.

A concentração de toxóide diftérico em uma composição da invenção é tipicamente de pelo menos 50 UI/ml.

30 A concentração de toxóide tetânico em uma composição

da invenção é tipicamente de pelo menos 100 UI/ml.

A proporção de toxóide diftérico para toxóide tetânico em composições da invenção é normalmente entre 2:1 e 3:1 (medida em unidades Lf), preferivelmente entre 2,4:1 e 2,6:1 e, mais preferivelmente, 2,5:1.

A quantidade de antígeno wP em composições da invenção é tipicamente pelo menos 8 UI/ml.

A quantidade de conjugado de Hib em composições da invenção, medida como sacarídeo, é tipicamente entre 10 e 30 µg/ml.

A quantidade de antígeno de HAV, medida em EU (Unidades Elisa), é tipicamente de pelo menos 600 EU/ml.

A quantidade de antígeno de IPV depende do sorotipo da cepa. Para um vírus do tipo 1, uma composição tipicamente contém cerca de 80 DU/ml. Para um vírus do tipo 2, uma composição tipicamente contém cerca de 16 DU/ml. Para um vírus do tipo 3, uma composição tipicamente contém cerca de 65 DU/ml.

A quantidade de um conjugado meningocócico em composições da invenção, medida como sacarídeo, é tipicamente entre 5 e 25 µg/ml para cada sorogrupo.

A quantidade de um conjugado pneumocócico em composições da invenção, medida como sacarídeo, é tipicamente entre 2 e 20 µg/ml para cada sorotipo.

As composições da invenção são administradas aos pacientes preferivelmente em doses de 0,5 ml. Referências às doses de 0,5 ml serão subentendidas como incluindo uma variância normal, por exemplo, 0,5 ml ± 0,05 ml.

A invenção pode fornecer material a granel adequado para embalagem em doses individuais, que podem então ser

distribuídas para administração aos pacientes. As concentrações mencionadas acima são tipicamente concentrações na dose embalada final e, dessa forma, as concentrações na vacina a granel podem ser maiores (por exemplo, para serem reduzidas até as concentrações finais por diluição).

As composições da invenção estarão geralmente na forma aquosa.

Material residual dos componentes antigênicos individuais também pode estar presente em quantidades residuais na vacina final produzida pelo processo da invenção. Por exemplo, caso seja usado formaldeído para o preparo dos toxóides diftéricos, tetânicos e de pertussis, o produto de vacina final poderá reter quantidades residuais de aldeído (por exemplo, menos do que 10 µg/ml, preferivelmente < 5 µg/ml). Meios ou estabilizantes podem ter sido usados durante a preparação de poliovírus (por exemplo, meio 199), e esses podem passar à vacina final. Da mesma forma, aminoácidos livres (por exemplo, alanina, arginina, aspartato, cisteína e/ou cistina, glutamato, glutamina, glicina, histidina, prolina e/ou, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptofano, tirosina e/ou valina), vitaminas (por exemplo, colina, ascorbato etc.), fosfato dissódico, fosfato monopotássico, cálcio, glicose, sulfato de adenina, vermelho fenol, acetato de sódio, cloreto de potássio etc. podem ser retidos na vacina final a ≤ 100 µg/ml, preferivelmente < 10 µg/ml, cada. Outros componentes de preparações de antígenos como, por exemplo, neomicina (por exemplo, sulfato de neomicina,

particularmente do componente de IPV), polimixina B (por exemplo, sulfato de polimixina B, particularmente do componente de IPV) etc. também podem estar presentes em quantidades subnanograma por dose. Um possível componente adicional da vacina final que se origina nas preparações de antígenos surge da purificação subtotal dos antígenos. Pequenas quantidades de proteínas e/ou DNA genômico de *B. pertussis*, *C. diphtheriae*, *C. tetani* e *S. cerevisiae* podem, portanto, estar presentes. Para minimizar as quantidades desses componentes residuais, as preparações de antígenos são preferivelmente tratadas para removê-los, antes de os antígenos serem usados no processo da invenção.

Quando for utilizado um componente de IPV, ele geralmente terá se desenvolvido em células Vero. A vacina final preferivelmente contém menos do que 10 ng/ml, preferivelmente ≤ 1 ng/ml, por exemplo, ≤ 500 pg/ml ou ≤ 50 pg/ml de DNA de células Vero, por exemplo, menos do que 10 ng/ml de DNA de células Vero, ou seja, um comprimento ≥ 50 pares de base.

20 **Embalagem das composições da invenção**

Após combinação dos HBsAg e dos adjuvantes, os processos da invenção podem compreender uma etapa de extração e embalagem de uma amostra de 0,5 ml da mistura em um recipiente. Para situações multidoses, quantidades de doses múltiplas serão extraídas e embaladas em conjunto em um único recipiente.

Os processos da invenção podem compreender a etapa adicional de embalagem da vacina em recipientes para utilização. Recipientes adequados incluem frascos e seringas descartáveis (preferivelmente, aquelas estéreis).

Quando uma composição da invenção for embalada em frascos, esses serão feitos preferivelmente de um material de vidro ou plástico. O frasco é preferivelmente esterilizado antes de a composição ser adicionada a ele. Para evitar problemas com pacientes sensíveis ao látex, os frascos são preferivelmente lacrados com uma tampa sem látex. O frasco pode incluir uma única dose de vacina, ou pode incluir mais de uma (um frasco "multidoses"), por exemplo, 10 doses. Quando se utiliza um frasco multidoses, cada dose deve ser retirada com uma agulha e uma seringa estéreis sob condições rigorosamente assépticas, tendo-se o cuidado de evitar a contaminação do conteúdo do frasco. Frascos preferidos são feitos de vidro.

Um frasco pode ter uma tampa (por exemplo, uma trava Luer) adaptada de tal forma que uma seringa pré-preenchida possa ser inserida na tampa, o conteúdo da seringa possa ser expelido no frasco (por exemplo, para reconstituir material liofilizado nele contido), e o conteúdo do frasco possa ser removido de volta para a seringa. Após remoção da seringa do frasco, uma agulha pode então ser anexada, e a composição pode ser administrada a um paciente. A tampa está localizada preferivelmente dentro de um lacre ou uma proteção, de tal forma que o lacre ou a proteção tenha que ser removida antes que a tampa possa ser acessada.

Quando a composição for embalada em uma seringa, a seringa normalmente não terá uma agulha a ela anexada, embora uma agulha separada possa ser fornecida com a seringa para montagem e utilização. Preferem-se agulhas de segurança. Agulhas com calibre de 23 com 2,54 centímetros, 25 com 2,54 centímetros e 25 com 1,588 centímetro são

típicas. As seringas podem ser fornecidas com rótulos destacáveis nos quais podem ser impressos o número do lote e a data de validade do conteúdo, para facilitar o registro. O êmbolo na seringa preferivelmente tem uma trava para evitar que o êmbolo seja removido acidentalmente durante a aspiração. As seringas podem ter uma tampa e/ou êmbolo de borracha de látex. Seringas descartáveis contêm uma única dose de vacina. A seringa geralmente terá uma tampa para lacrar a ponta, antes da anexação de uma agulha, e a tampa da ponta é feita preferivelmente de borracha de butil. Caso a seringa e a agulha sejam embaladas separadamente, a agulha será preferivelmente adaptada com uma proteção de borracha de butil. Prefere-se a borracha de butil cinza. Seringas preferidas são aquelas comercializadas sob o nome comercial de "Tip-Lok"™.

Quando é utilizado um recipiente de vidro (por exemplo, uma seringa ou um frasco), prefere-se utilizar um recipiente feito vidro de borossilicato, em vez de um vidro de cal sodada.

Após uma composição ter sido embalada em um recipiente, o recipiente poderá então ser colocado em uma caixa para distribuição, por exemplo, dentro de uma caixa de papelão, e a caixa será rotulada com detalhes da vacina, por exemplo, seu nome comercial, uma lista dos antígenos na vacina (por exemplo, "hepatite B recombinante" etc.), o recipiente de apresentação (por exemplo, "Seringas Descartáveis Pré-Preenchidas Tip-Lok" ou "Frascos de Dose Única 10x0,5 ml"), sua dose (por exemplo, "cada uma contendo uma dose de 0,5 ml"), avisos (por exemplo, "Somente para uso adulto" ou "Somente para uso

pediátrico"), uma data de validade, uma indicação (por exemplo, "imunização ativa contra infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) causada por todos os subtipos conhecidos para pacientes com insuficiência renal (incluindo em 5 pacientes em pré-hemodiálise e em hemodiálise), a partir da idade de 15 anos" etc.), um número de patente etc. Cada caixa pode conter mais de uma vacina embalada, por exemplo, cinco ou dez vacinas embaladas (especialmente para frascos). Caso a vacina esteja contida em uma seringa, a 10 embalagem poderá mostrar uma figura da seringa.

A vacina pode ser embalada juntamente (por exemplo, na mesma caixa) com um folheto que inclui detalhes da vacina, por exemplo, instruções para administração, detalhes dos antígenos contidos, da vacina etc. As instruções também 15 podem conter avisos, por exemplo, para manter uma solução de adrenalina prontamente disponível em caso de reação anafilática após a vacinação etc.

A vacina embalada é estocada preferivelmente entre 2°C e 8°C. Ela não deve ser congelada.

20 As vacinas podem ser fornecidas na forma totalmente líquida (ou seja, em que todos os componente antigênicos estão em uma solução ou suspensão aquosa) durante a fabricação, ou elas podem ser preparadas em uma forma na qual alguns componentes estejam na forma líquida e outros 25 na forma liofilizada. Dessa forma, uma vacina final pode ser preparada de forma extemporânea no momento de uso misturando-se em conjunto dois componentes: (a) um primeiro componente que compreende antígenos aquosos; e (b) um segundo componente que compreende antígenos liofilizados. 30 Os dois componentes estão preferivelmente em recipientes

separados (por exemplo, frascos e/ou seringas), e a invenção fornece um kit que compreende os componentes (a) e (b). Esse formato é particularmente útil para vacinas que incluem um componente conjugado, particularmente conjugados Hib e/ou meningocócicos e/ou pneumocócicos, na medida em que esses podem ser mais estáveis na forma liofilizada. Dessa forma, os conjugados podem ser liofilizados antes de seu uso com invenção. Componentes adicionais também podem ser adicionados antes da liofilização, por exemplo, estabilizantes. Estabilizantes preferidos para inclusão são lactose, sacarose e manitol, além de misturas destes, por exemplo, misturas de lactose/sacarose, misturas de sacarose/manitol etc. dessa forma, a vacina final pode conter lactose e/ou sacarose. O uso de misturas de sacarose/manitol pode acelerar o processo de secagem.

Dessa forma, a invenção fornece um processo para a preparação de uma vacina combinada com dois recipientes, que compreende as seguintes etapas:

- preparação de uma vacina combinada aquosa, como descrita acima, mas em que aqueles um ou mais antígenos não incluem um antígeno sacarídico capsular conjugado;
- a embalagem da referida vacina combinada em um primeiro recipiente (por exemplo, uma seringa);
- preparação de um antígeno sacarídico capsular conjugado na forma liofilizada;
- embalagem do referido antígeno liofilizado em um segundo recipiente (por exemplo, um frasco); e
- embalagem do primeiro recipiente e do segundo recipiente juntos em um kit.

O kit pode então ser distribuído aos médicos.

Os componentes de D, T, P e HBsAg estão preferivelmente na forma líquida.

Métodos de tratamento e administração da vacina

As composições da invenção são adequadas para administração a pacientes humanos, e a invenção fornece um método de despertar uma resposta imunológica em um paciente, que compreende a etapa de administração de uma composição da invenção ao paciente.

A invenção também fornece uma composição da invenção para uso em medicina.

A invenção também fornece o uso de: (i) HBsAg purificado por células de levedura recombinantes, em que o processo de purificação envolve a ruptura das células de levedura na presença de um tensoativo não-iônico, e (ii) um ou mais antígenos não-HBV, na fabricação de um medicamento para administração a um paciente.

As composições imunogênicas da invenção são preferivelmente vacinas, para uso na prevenção e/ou tratamento, pelo menos, de infecção pelo vírus da hepatite B. Pacientes que receberam composições da invenção preferivelmente possuem uma titulação sérica anti-HBsAg GM ≥ 500 mUI/ml, medida 6 semanas após a primeira imunização. Mais preferivelmente, a titulação é ≥ 500 mUI/ml, quando medida após 12 meses.

A fim de obter eficácia plena, um esquema típico de imunização primária para uma criança pode envolver a administração de mais de uma dose. Por exemplo, as doses podem ocorrer em: 0 e 6 meses (o tempo 0 sendo a primeira dose); em 0, 1, 2 e 6 meses; no dia 0, 21º dia, e depois uma terceira dose entre 6 e 12 meses; em 2, 4 e 6 meses; em

3, 4 e 5 meses; em 6, 10 e 14 semanas; ou em 0, 1, 2, 6 e 12 meses.

As composições também podem ser usadas como doses de reforço, por exemplo, para crianças, no segundo ano de vida. As composições também podem ser administradas por injeção intramuscular, no braço ou na perna.

As vacinas produzidas pela invenção podem ser administradas aos pacientes ao mesmo tempo em que uma vacina separada de conjugado pneumocócico como, por exemplo, Prevnar™.

Quando as composições da invenção incluírem um adjuvante baseado em alumínio, poderá ocorrer deposição dos componentes durante a estocagem. Portanto, a composição deve ser agitada antes da administração a um paciente. A composição agitada será uma suspensão branca turva.

Vacinas preferidas

As composições imunogênicas multivalentes específicas da invenção incluem:

- Uma composição pentavalente que compreende HBsAg, D, T, Pa e IPV. A vacina está na forma aquosa. Ela inclui adjuvantes tanto de hidróxido de alumínio quanto de fosfato de alumínio. HBsAg é adsorvido ao fosfato de alumínio. D, T e Pa são adsorvidos ao hidróxido de alumínio. Quantidades por ml: cerca de 50 Lf de toxóide diftérico; cerca de 20 Lf de toxóide tetânico; cerca de 50 µg de PT; cerca de 50 µg de FHA; cerca de 16 µg de pertactina; cerca de 20 µg de HBsAg; cerca de 80 DU de poliovírus do tipo 1; cerca de 16 DU de poliovírus do tipo 2; cerca de 64 DU de poliovírus do tipo 3. Dose: cerca de 0,5 ml. Pode ser apresentada em seringa pré-preenchida.

- Uma composição pentavalente que compreende HBsAg, D, T, Pa e IPV. A vacina está na forma aquosa. Ela inclui adjuvantes tanto de hidróxido de alumínio quanto de fosfato de alumínio. HBsAg é adsorvido ao fosfato de alumínio. D, T e Pa são adsorvidos ao hidróxido de alumínio. Quantidades por ml: pelo menos 60 UI de toxóide diftérico; pelo menos 80 UI de toxóide tetânico; cerca de 50 µg de PT; cerca de 50 µg de FHA; cerca de 16 µg de pertactina; cerca de 20 µg de HBsAg; cerca de 80 DU de poliovírus do tipo 1; cerca de 16 DU de poliovírus do tipo 2; cerca de 64 DU de poliovírus do tipo 3. Dose: cerca de 0,5 ml. Pode ser apresentada em seringa pré-preenchida.

- Uma composição tetravalente que compreende HBsAg, D, T e Pw. Os componentes estão na forma aquosa. Ela inclui adjuvantes tanto de hidróxido de alumínio quanto de fosfato de alumínio. HBsAg é adsorvido ao fosfato de alumínio. D e T são adsorvidos ao hidróxido de alumínio. A composição inclui timerosal, mas preferivelmente não contém 2-fenoxietanol. Quantidades por ml: pelo menos 60 UI de toxóide diftérico; pelo menos 120 UI de toxóide tetânico; pelo menos 8 UI de Pw; cerca de 20 µg de HbsAg. Dose: cerca de 0,5 ml.

- Uma composição pentavalente que compreende HBsAg, D, T, Pw e um conjugado de Hib-T. Os componentes de HBsAg, D, T e Pw estão na forma aquosa; o Hib-T está liofilizado. Ela inclui adjuvantes tanto de hidróxido de alumínio quanto de fosfato de alumínio. D e T são adsorvidos ao hidróxido de alumínio. HBsAg e Hib-T são adsorvidos ao fosfato de alumínio. O Hib-T liofilizado inclui lactose. O componente aquoso pode incluir timerosal. Quantidades por ml: pelo

menos 60 UI de toxóide diftérico; pelo menos 120 UI de toxóide tetânico (mais entre 5-25 µg de toxóide tetânico como veículo em Hib-T); pelo menos 8 UI de Pw; cerca de 20 µg de HBsAg; cerca de 5 µg de Hib-T, medido como sacarídeo.

5 Dose: cerca de 0,5 ml.

- Uma composição heptavalente que compreende HBsAg, D, T, Pw e três conjugados: um conjugado de Hib-T, um conjugado de MenA e um conjugado de MenC. Os componentes de HBsAg, D, T e Pw estão na forma aquosa; os três conjugados
10 estão liofilizados. Ela inclui adjuvantes tanto de hidróxido de alumínio quanto de fosfato de alumínio. D e T são adsorvidos ao hidróxido de alumínio. HBsAg é adsorvido ao fosfato de alumínio. O componente liofilizado pode incluir lactose e/ou sacarose. O componente aquoso pode
15 incluir timerosal. Quantidades potenciais por ml: pelo menos 60 UI de toxóide diftérico; pelo menos 120 UI de toxóide tetânico (mais entre 5-25 µg de toxóide tetânico como veículo em Hib-T); pelo menos 8 UI de Pw; cerca de 20 µg de HBsAg; cerca de 5 µg de cada conjugado, medido como
20 sacarídeo. Dose: cerca de 0,5 ml.

Essas composições podem ser usadas como vacinas por si próprias, ou como componentes de vacinas adicionais. Por exemplo, a invenção fornece uma composição hexavalente que compreende a composição pentavalente HBsAg-D-T-Pa-IPV
25 descrita acima, mais um conjugado de Hib-T liofilizado. O Hib-T liofilizado preferivelmente não é adsorvido a um sal de alumínio. A invenção também fornece uma composição heptavalente que compreende a composição pentavalente HBsAg-D-T-Pa-IPV descrita acima, mais conjugados de Hib-T
30 liofilizado e MenC. A invenção também fornece uma

composição octavalente que compreende a composição pentavalente HBsAg-D-T-Pa-IPV descrita acima, mais conjugados de Hib-T liofilizado, MenC e MenY. A invenção também fornece uma composição pentavalente que compreende a
5 composição tetravalente HBsAg-D-T-Pw descrita acima, mais um conjugado de Hib-T liofilizado. A invenção também fornece uma composição heptavalente que compreende a composição tetravalente HBsAg-D-T-Pw descrita acima, mais uma mistura liofilizada de conjugado de Hib-T, conjugado de
10 MenA e conjugado de MenC. As vacinas finais podem ser preparadas por reconstituição dos materiais liofilizados com os materiais aquosos que contêm HBsAg no momento do uso, e os componentes liofilizados e aquosos são preferivelmente embalados em conjunto em um kit, como
15 descrito acima.

Processos da invenção específicos incluem aqueles que compreendem as seguintes etapas:

- Purificar o HBsAg de acordo com a invenção, adsorver o HBsAg ao adjuvante de fosfato de alumínio; obter uma
20 mistura bivalente D-T sem timerosal com adjuvante de hidróxido de alumínio; obter PT, FHA e pertactina para o componente de Pa; obter antígenos IPV, como um pool dos tipos 1, 2 e 3, preferivelmente sem adjuvante de sal de alumínio; combinar D-T, Pa, IPV e HBsAg, em qualquer ordem,
25 para gerar uma combinação pentavalente final; opcionalmente, embalar em uma seringa.

- Purificar HBsAg de acordo com a invenção, adsorver o HBsAg ao adjuvante de fosfato de alumínio; obter a mistura trivalente D-T-Pw sem 2-fenoxietanol, contendo timerosal
30 com adjuvantes de hidróxido de alumínio e de fosfato de

alumínio; combinar D-T-Pw e HBsAg para gerar a combinação tetravalente; opcionalmente, embalar em seringa; opcionalmente, embalar em combinação com componente(s) conjugado(s) liofilizado(s), por exemplo, Hib-T, MenA, 5 MenC.

- Purificar HBsAg de acordo com a invenção; adsorver HBsAg ao adjuvante de fosfato de alumínio; obter a mistura trivalente D-T-Pw sem 2-fenoxietanol, contendo timerosal, com adjuvantes de hidróxido de alumínio e de fosfato de 10 alumínio; obter conjugado de Hib-T liofilizado; combinar D-T-Pw e HBsAg para gerar o componente tetravalente aquoso; embalar o componente tetravalente aquoso em um frasco de vidro; embalar Hib-T e/ou MenC e/ou MenY liofilizados em um frasco de vidro; combinar os dois frascos a serem 15 apresentados em um kit único para reconstituição para gerar uma vacina combinada pentavalente. Os frascos de vidro podem ser de vidro do tipo I e possuir tampas de borracha de butil.

- Purificar HBsAg de acordo com a invenção; adsorver 20 HBsAg ao adjuvante de fosfato de alumínio; obter a mistura trivalente D-T-Pw sem 2-fenoxietanol, contendo timerosal, com adjuvantes de hidróxido de alumínio e de fosfato de alumínio; obter antígenos IPV, como um pool dos tipos 1, 2 e 3, preferivelmente sem adjuvante de sal de alumínio; 25 combinar D-T-Pw, IPV e HBsAg em qualquer ordem, para gerar a combinação pentavalente final; opcionalmente, embalar em uma seringa; opcionalmente, embalar em combinação com componente(s) conjugado(s) liofilizado(s), por exemplo, Hib-T, MenA, MenC.

30 Podem ser acrescentados componentes adicionais em

qualquer estágio, por exemplo, cloreto de sódio, adjuvantes, conservantes etc. Esses processos podem ser usados, por exemplo, para a preparação das vacinas descritas acima.

5 As diferentes etapas do processo podem ser realizadas substancialmente ao mesmo tempo, ou podem ser efetuadas separadamente. Elas podem ser realizadas no mesmo local ou em locais diferentes, até mesmo em países diferentes; por exemplo, a purificação do HBsAg pode ocorrer em um local
10 diferente da liofilização de Hib-T.

Proteínas transportadoras para os conjugados

Os antígenos sacarídicos conjugados incluem uma proteína transportadora, à qual o sacarídeo é anexado de forma covalente, tanto diretamente quanto através de um
15 vinculador. Informações gerais sobre as técnicas de conjugação podem ser encontradas na referência 45.

São conhecidas várias proteínas para uso como transportadoras, e proteínas transportadoras preferidas são toxinas ou toxóides bacterianos, tais como toxóide
20 diftérico ou toxóide tetânico. Outras proteínas transportadoras adequadas incluem, sem limitação, o mutante CRM197 da toxina diftérica [75-77], a proteína da membrana externa de *N. meningitidis* [78], peptídeos sintéticos [79, 80], proteínas de choque térmico [81,82], proteínas de
25 pertussis [83,84], citocinas [85], linfocinas [85], hormônios [85], fatores de crescimento [85], proteínas artificiais que compreendem vários epitopos de células T CD4⁺ humanas de vários antígenos derivados de patógenos [86], tais como N19 [87], proteína D de *H. influenza*
30 [88,89], proteína de superfície pneumocócica PspA [90],

pneumolisina [91], proteínas de captação de ferro [92], toxina A ou B de *C. difficile* [93], proteínas de *S. agalactiae* [94] etc.

A anexação de um sacarídeo a um veículo é feita preferivelmente por meio de um grupo $-NH_2$, por exemplo, na cadeia lateral de um resíduo de lisina em uma proteína transportadora, ou de um resíduo de arginina. A anexação aos grupos $-SH$ (por exemplo, na cadeia lateral de uma cisteína) também é possível.

10 Preferem-se conjugados com uma proporção de sacarídeo-proteína (p/p) entre 1:5 (ou seja, proteína em excesso) e 5:1 (ou seja, sacarídeo em excesso).

As composições podem incluir uma pequena quantidade de veículo livre. Desconsiderando-se qualquer veículo incluído como um antígeno separado, o veículo não conjugado é preferivelmente de, no máximo, 5% da quantidade total da proteína transportadora na composição como um todo e, mais preferivelmente, está presente em menos do que 2% por peso.

20 É possível incluir mais de um tipo de proteína transportadora em uma composição, por exemplo, para reduzir o risco de supressão do veículo.

A proteína transportadora usada para conjugados de *N. meningitidis* pode ser a proteína D de *H. influenzae*. Essa proteína é descrita em detalhe nas referências 95 e 96, e seu uso como proteína transportadora em conjugados é descrito na referência 97. O termo "proteína D" inclui fragmentos da proteína de comprimento total nativa, como revelada na referência 97, e também proteínas de fusão que compreendem a proteína D de comprimento total ou esses
30 fragmentos (por exemplo, uma fusão de um fragmento da

proteína NS1 do vírus influenza e um fragmento de proteína D). Os fragmentos reterão a habilidade para converter antígenos sacarídicos T-independentes em um antígeno T-dependente quando a eles conjugados. Fragmentos típicos
5 irão incluir pelo menos 1/3 do terminal N da proteína D. A proteína pode ser convenientemente expressa em *E. coli* [96], e esse material recombinante é preferido para uso com a invenção [97].

Geral

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

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

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

A menos que especificado de forma diferente, um processo que compreende uma etapa de mistura de dois ou mais componentes não exige qualquer ordem de mistura específica. Dessa forma, os componentes podem ser
25 misturados em qualquer ordem. Quando houver três componentes, dois componentes poderão ser combinados uns com os outros, e depois a combinação poderá ser combinada com o terceiro componente etc.

Quando um antígeno é descrito como sendo "adsorvido" a
30 um adjuvante, prefere-se que pelo menos 50% (por peso)

daquele antígeno seja adsorvido, por exemplo, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou mais. Prefere-se que o toxóide diftérico e o toxóide tetânico sejam, ambos, totalmente adsorvidos, ou seja, que nenhum deles seja detectável no sobrenadante. A adsorção total do HBsAg pode ser usada.

As quantidades de toxóide diftérico podem ser expressas em unidades internacionais (UI). Por exemplo, o NIBSC fornece o "Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard 1999" [98,99], que contém 160 UI por ampola. Como alternativa ao sistema de UI, a unidade "Lf" ("unidades de floculação" ou a "dose-limite de floculação") é definida como a quantidade de toxóide que, quando misturada com uma Unidade Internacional de antitoxina, produz uma mistura de floculação ótima [100]. Por exemplo, o NIBSC fornece "Diphtheria Toxoid, Plain" [101], que contém 300 LF por ampola, e também fornece "The 1st International Reference Reagent For Diphtheria Toxoid For Flocculation Test" [102], que contém 900 LF por ampola.

As quantidades de toxóide tetânico podem ser expressas em unidades internacionais (UI). Por exemplo, o NIBSC fornece o "Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000" [103, 104], que contém 469 UI por ampola. Alternativamente ao sistema de UI, a "unidade Lf" ("unidades de floculação" ou a "dose-limite de floculação") é definida como a quantidade de toxóide que, quando misturada com uma Unidade Internacional de antitoxina, produz uma mistura de floculação ótima [100]. Por exemplo, o NIBSC fornece "The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test" [105], que contém 1.000 LF por ampola.

As quantidades de antígenos wP podem ser expressas em unidades internacionais (UI). Por exemplo, o NIBSC fornece o "Third International Standard For Pertussis Vaccine" [106], que contém 46 UI por ampola. Cada ampola contém o resíduo liofilizado de alíquotas de 2,0 ml de uma solução aquosa que continha 10 litros de suspensão bacteriana (equivalente a 180 unidades de opacidade em termos do Padrão de Opacidade U.S.) diluídos com oito litros de tampão M/15 de Sorensen, pH 7,0. Alternativamente ao sistema de UI, a unidade "OU" ("unidades de opacidade") também é usada (por exemplo, 4 OU equivale a aproximadamente 1 UI).

As quantidades de conjugados são geralmente apresentadas em termos de massa de sacarídeo (ou seja, a dose do conjugado (veículo + sacarídeo) como um todo é maior do que a dose estabelecida) a fim de evitar variações causadas pela escolha do veículo.

Quando forem usados materiais animais (e, particularmente, bovinos) na cultura de células, eles deverão ser obtidos de fontes livres de encefalopatias espongiiformes transmissíveis (TSEs) e, em particular, livres de encefalopatia espongiiforme bovina (BSE).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma cópia da Figura 2 das referências 3 e 4, que estabelecem que a figura ilustra "antigenicidade e imunogenicidade com base em um método de adsorção no qual a amostra 1 é uma amostra na qual é adicionado um excesso de gel de hidróxido de alumínio após uma combinação de cada componente da vacina estar completo, e a amostra 2 é uma amostra na qual o referido adsorvente da mesma concentração

é adicionado previamente, antes do término da combinação". As figuras 1A e 1B ilustram a antigenicidade relativa das amostras 1 e 3, respectivamente. As figuras 1C e 1D ilustram o nível relativo de formação de anticorpos contra cada antígeno das amostras 1 e 2, respectivamente.

A Figura 2 mostra resultados de *western blot* para a estabilidade de HBsAg em uma composição. Na Figura 2A, as raias são: (1) tampão de amostra Laemmli (LSB); (2) marcadores de PM; (3-5) 1 µg de três preparações separadas de HBsAg de controle; (6-8) sobrenadante de três lotes pentavalentes separados; (9-10) LSB. Nas Figuras 2B e 2C, as raias são: (1) marcadores de PM; (2-4) 1 µg de três preparações separadas de HBsAg de controle; (5-7) sobrenadante de três lotes pentavalentes separados, estocados por 2 semanas a 2-8°C; (8-10) sobrenadante de três lotes pentavalentes separados, estocados por 2 semanas a 36-38°C. Na Figura 2D, as raias são: (1) marcadores de PM; (2) HBsAg de controle; (3-5) sobrenadante de três lotes pentavalentes separados.

A Figura 3 mostra a variação de pH ao longo do tempo para uma composição pentavalente.

A Figura 4 mostra resultados de *western blot* para a estabilidade de HBsAg em uma composição octavalente. Nas Figuras 4A e 4B: a raia 1 contém marcadores de PM; a raia 2 contém um controle de HBsAg a 1 µg/ml; a raia 3 contém o sobrenadante da composição octavalente. Na Figura 4B: a raia 4 contém LSB; a raia 5 contém o mesmo controle que a raia 2; a raia 6 contém um extrato de DOC/TCA.

MÉTODOS PARA A PRÁTICA DA INVENÇÃO

30 **Expressão e purificação de HBsAg**

Foi preparado um hospedeiro de levedura *H. polimorpha* que codifica HBsAg [107,108]. Cem litros de meio foram preparados em um fermentador de 300 litros, e inoculados com a levedura. A fermentação prosseguiu até que as células
5 estivessem presentes a 100 gramas/litro. Nesse estágio, como o hospedeiro é metiloptrófico, foi adicionado metanol, e a fermentação foi interrompida. O volume da cultura final foi de 160-170 litros. As células foram coletadas do meio de cultura por centrifugação.

10 Em vez de adicionar tensoativos não-iônicos ao HBsAg após a purificação, como descrito nas referências 3 e 4, o tensoativo foi usado durante a purificação da proteína. Em particular, as células de levedura coletadas foram suspensas em tampão fosfato contendo polissorbato 20 0,1-
15 0,2% e 10 mM de EDTA. A suspensão foi resfriada e rompida usando um homogeneizador líquido de alta pressão.

A suspensão de células homogeneizada foi então clarificada por centrifugação. Após adição de NaCl ao sobrenadante, foi adicionado polietileno glicol lentamente,
20 até uma concentração de 3-5% por precipitação. A solução foi agitada por 5 minutos, deixada em repouso por 30 minutos, e centrifugada por 10 minutos. Foi acrescentado mais PEG lentamente ao sobrenadante até 8-10%, agitado e deixado em repouso por 2 horas. Essa solução foi
25 centrifugada por 10 minutos.

Silica fumada foi adicionada ao sobrenadante em uma concentração de 1-2%. A solução foi agitada por 12 minutos, centrifugada, e o precipitado foi dissolvido completamente em um tampão de bórax contendo desoxicolato de sódio. Após
30 agitação por 100-120 minutos em um banho-maria, a solução

foi centrifugada e o sobrenadante foi coletado. O sobrenadante foi carregado em uma coluna de DEAE que havia sido equilibrada com tampão Tris/Cl a uma taxa de fluxo de 200ml/min, e eluido com tampão Tris/Cl, contendo solução de NaCl. Foi adicionado cloreto de césio à DEAE, eluído até uma concentração de 1,2 g/ml, e a solução foi centrifugada a 40.000 rpm. O pool dessalinizado de CsCl foi diluído com pBS até uma concentração de proteína de 400 µg/ml, foi acrescentada formalina até uma concentração de 0,025%, e a mistura foi deixada em repouso por 72 horas. Finalmente, a formalina residual foi removida com o uso de PBS.

Dessa forma, o HBsAg foi purificado com inclusão de polissorbato 20, mas o tensoativo foi adicionado antes da ruptura das células recombinantes, em vez de ser adicionado após o antígeno ter sido purificado.

Vacinas multivalentes totalmente líquidas

HBsAg expresso em levedura, toxóide diftérico, toxóide tetânico e antígenos de pertussis de célula inteira foram adicionados a uma suspensão de um adjuvante de sal de alumínio. O pH da mistura foi ajustado, e depois foi acrescentado um conjugado de Hib-CRM197, de tal forma que ele não fosse adsorvido ao adjuvante de alumínio. Esse processo gerou uma vacina pentavalente com a seguinte composição:

Componente	Concentração
Toxóide diftérico	15 Lf/ml
Toxóide tetânico	6,5 Lf/ml
Antígeno de pertussis de célula inteira	30 OU/ml
HBsAg	20 µg/ml

CRM-Hib	20 µg/ml (como sacarídeo)
Al ⁺³	0,6 mg/ml
NaCl	9 mg/ml

Em um trabalho adicional, conjugados meningocócicos-CRM197 separados de cada um dos sorogrupos C, W135 e Y foram adicionados após o componente CRM-Hib a fim de gerar uma vacina octavalente:

Componente	Concentração
Toxóide diftérico	15 Lf/ml
Toxóide tetânico	6,5 Lf/ml
Antígeno de pertussis de célula inteira	30 OU/ml
HBsAg	20 µg/ml
CRM-Hib	20 µg/ml
CRM-MenC	20 µg/ml
CRM-MenW135	20 µg/ml
CRM-MenY	20 µg/ml
Al ³⁺	0,6 µg/ml
NaCl	9 µg/ml

5 Um parâmetro importante para a estabilidade e eficácia da vacina é a percentagem de hidrólise de conjugado de Hib, com o limite clínico sendo de 25% de sacarídeo livre (a referência 109 relata que a proporção de 20% não afetou a imunogenicidade clínica). Esse parâmetro foi medido na

10 vacina pentavalente por HPAEC-PAD, o que permite a quantificação direta de carboidratos não conjugados a níveis picomolares, com separação mínima e nitidez. A análise se concentrou na quantidade de sacarídeo livre.

A quantidade de sacarídeo livre foi avaliada e

15 expressa como uma percentagem da quantidade total. Os

resultados foram os seguintes:

Lote	Tempo	Livre
1	0	5,3%
	2 semanas, 2-8°C	5,7%
	2 semanas, 36-38°C	6,8%
	4 semanas, 2-8°C	6,5%
	4 semanas, 36-38°C	11,6%
2	0	3,0%
	2 semanas, 2-8°C	3,1%
	2 semanas, 36-38°C	5,5%
	4 semanas, 2-8°C	3,7%
	4 semanas, 36-38°C	8,1%
3	0	3,3%
	2 semanas, 2-8°C	4,0%
	2 semanas, 36-38°C	6,3%
	4 semanas, 2-8°C	4,1%
	4 semanas, 36-38°C	8,7%

Um máximo de 25% de sacarídeo livre é clinicamente aceitável. Todos os valores ficaram abaixo desse limite, e ficaram abaixo de 6,5% por até 4 semanas a 2-8°C. Sob condições de estresse térmico (4 semanas a 36-38°C), foi observado um nível maior, mas ainda bem abaixo do valor de 25%, com o máximo sendo de 11,6% para o lote 1. Um trabalho anterior sobre vacinas multivalentes contra o Hib demonstrou que um mês de estocagem a 36-38°C gera mais hidrólise de CRM-Hib do que dois anos de estocagem a 2-8°C. Assim, pode-se esperar uma hidrólise aceitável ao longo de uma escala de tempo de pelo menos a 2 anos sob condições

normais de estocagem.

Também foi realizada análise HPAEC-PAD do sacarídeo livre após 6 meses a 2-8°C. Os dados foram os seguintes:

Lote	Livre
1	8,3%
2	5,5%
3	5,8%

Dessa forma, há somente um pequeno aumento na
5 percentagem de sacarídeo livre em 6 meses, comparado com 4
semanas, com valores ainda bem abaixo do valor de 25%.
Portanto, CRM197-Hib é muito estável nas três formulações.

A Figura 3A mostra a variação do PH na vacina
pentavalente ao longo de 6 meses para três lotes estocados
10 a 2-8°C. A Figura 3B mostra a variação do pH ao longo de 4
semanas para três lotes estocados a 36-38°C. A 2-8°C, o pH
ficou estável ao longo de 6 meses, enquanto, sob condições
de estresse térmico, houve uma ligeira queda de 0,1 unidade
de pH após 2 semanas, e uma ligeira queda adicional após 4
15 semanas. Mesmo assim, todos os valores de pH permaneceram
dentro da faixa aceita de 6,0-7,0.

A osmolaridade de todos os três lotes pentavalentes
ficou entre 312 e 315 mOsm/kg, centralmente dentro da
faixa-alvo de 240-360 mOsm/kg para vacinas injetáveis.

20 A avaliação da potência e da imunogenicidade de
antígenos é importante para avaliar a eficácia da vacina
combinada. Foi avaliada a potência dos antígenos de
difteria, tétano e de pertussis na vacina pentavalente, e
foi testada a imunogenicidade tanto de CRM-Hib quanto de
25 HBsAg. A análise por ELISA foi efetuada para avaliar o
nível de anticorpos específicos após imunização. A

imunogenicidade de HBsAg foi realizada com o uso de um modelo de camundongo e um esquema de imunização diferente em relação àquele usado para a potência de HBV.

Os valores da potência de DTP foram os seguintes:

	D	T	P
Lote 1	41	161	4
Lote 2	39	138	5
Lote 3	39	143	6

5 Para cada um desses três antígenos, os resultados do teste de potência estão todos significativamente acima dos limites inferiores aceitos, e esses resultados indicam boa eficácia para esses três antígenos.

Para avaliar a imunogenicidade do HBsAg, grupos de 10 camundongos CD1 receberam a vacina pentavalente por injeção subcutânea (0,5 ml, diluído a 1:4 em soro fisiológico) nos dias 0 e 14. Os camundongos foram sangrados no 21º dia, e os anticorpos específicos para HBsAg foram avaliados por ELISA, usando: (a) o teste "Enzygnost Anti-HBs II" (Dade Behring) ou (b) o teste "Ausab EIA" (Abbott). Esses testes ELISA possuem formatos diferentes e sensibilidades diferentes ao HBsAg. Os valores da média geométrica da titulação (GMT) não são, portanto, comparáveis entre os dois testes. No entanto, dentro de escopo de cada teste, os valores da GMT para os soros foram ótimos. Os resultados foram os seguintes:

	Enzygnost		Ausab EIA	
	GMT	% de responsivos	GMT	% de responsivos
Lote 1	1.008	100	192	100
Lote 2	1.518	100	194	100

Lote 3	461	90	127	100
Apenas adjuvante	2	0	2	0

Todos os valores de GMT obtidos com a realização desse tipo de ensaio de imunogenicidade em camundongos são maiores do que os valores relatados na literatura. A percentagem de responsivos é consistentemente mais elevada para ambos os antígenos em um nível ótimo de ~100%.

Para avaliar a imunogenicidade de Hib, grupos de 8 camundongos CD1 receberam a vacina pentavalente por injeção subcutânea (0,5 ml, diluído a 1:4 em soro fisiológico) nos dias 0, 10 e 20. Os camundongos foram sangrados no 34° dia, e os anticorpos específicos para Hib foram avaliados por ELISA. Os resultados foram os seguintes:

	% de responsivos
Lote 1	100
Lote 2	100
Lote 3	100
Apenas adjuvante	0

A adsorção de HBsAg ao adjuvante de alumínio é um fator importante para a imunogenicidade da vacina, e esse parâmetro foi medido por *immunoblot*. O procedimento de *immunoblot* seguido foi essencialmente o seguinte: um volume de 1 ml de sobrenadante da vacina foi precipitado por DOC/TCA e desnaturado com LSB, e depois carregado em um SDS-PAGE de acrilamida 12%; 1 µg de cada lote de HBsAg foi carregado como controle; uma preparação de anticorpo de cabra anti-HBsAg foi usada como anticorpo primário (diluída a 1:1.000), e um conjugado POD anti-cabra (diluído 1:2.500) foi usado como anticorpo secundário.

Resultados para a vacina pentavalente são mostrados na Figura 2. As raias 6-8 da Figura 2A mostram que não há HBsAg solúvel detectável na composição no momento zero, e as raias 5-10 das Figuras 2B e 2C confirmam que isso permanece ocorrendo após 2 semanas e 4 semanas de estocagem a 2-8°C ou 36-38°C. Em três lotes diferentes, ~99% de HBsAg permaneceram adsorvidos no adjuvante sob essas várias condições.

Foi realizado um teste adicional de estabilidade após 6 meses de estocagem a 2-8°C (Figura 2D). A adsorção permaneceu a ~99% para cada um dos três lotes.

Os controles positivos usados na Figura 2 continham 1 µg de HBsAg. Foi observada uma única banda correspondendo ao peptídeo S (24 kDa), mais uma banda característica de agregados (~45 kDa). Pré-S2 não foi observado.

A vacina octavalente também foi testada quanto à adsorção de HBsAg de forma similar. Uma amostra de 1 ml foi centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido para um tubo fresco e precipitado com DOC/TCA. O pélete foi re-suspenso em 200 µl de tampão de extração, fervido por 5 minutos, e centrifugado a 1.300 rpm por 10 minutos. Vinte µl desse extrato e o sobrenadante precipitado com DOC/TCA foram carregados em um SDS-PAGE 12% para *Western-Blot*.

A Figura 4A mostra a vacina octavalente no momento zero, e a Figura 4B mostra a vacina após 8 meses de estocagem a 2-8°C. A ausência de qualquer coloração significativa nas raias 3 e 6 da Figura 4B (certamente menos coloração do que a observada com 1 µg de HBsAg nas raias de controle 2 e 5) mostra que a adsorção de HBsAg

permanece estável ao longo desse período de estocagem.

Vacina multivalente líquida/liofilizada

São coletados três componentes antigênicos da seguinte forma:

5 - UM COMPONENTE TRIVALENTE D-T-Pw: foi preparado um componente de D-T-Pw que inclui toxóide diftérico adsorvido a um adjuvante de hidróxido de alumínio, toxóide tetânico, também adsorvido a um adjuvante de hidróxido de alumínio e antígenos de pertussis de célula inteira. O componente de
10 D-T-Pw também inclui um adjuvante de fosfato de alumínio. Esse componente contém timerosal, mas não contém 2-fenoxietanol.

 - UM COMPONENTE DE HBsAg: o HBsAg é expresso e purificado por uma levedura recombinante, e é adsorvido em
15 um antígeno de fosfato de alumínio [110].

 - UM COMPONENTE DE CONJUGADO Hib: o polissacarídeo de Hib é preparado a partir de Hib, cepa 20752 e, após ativação com brometo de cianogênio e derivatização com um espaçador de hidrazida adípica, é acoplado de forma
20 covalente a um toxóide tetânico através de uma condensação de carbodiimida, em uma proporção de peso de sacarídeo:veículo de 1:3. O conjugado é adsorvido a um adjuvante de fosfato de alumínio [64], e depois liofilizado com lactose.

25 O componente de D-T-Pw é misturado com o componente de HBsAg. O nível de HBsAg é de 20 µg/ml. O nível de D é \geq 60 UI. O nível de T é \geq 120 UI. O nível de Pw é \geq 8 UI. A mistura tetravalente, na forma de uma suspensão branca turva, é embalada em forma aquosa em frascos de vidros com
30 uma tampa de borracha de butil, para conter 1 dose (0,5

ml), 2 doses (1 ml) ou 10 doses (5 ml). O componente de Hib
liofilizado também é colocado em frascos. A quantidade de
pó por frasco é medida para gerar 5 µg/ml (medida como
sacarídeo) após reconstituição, com 1 dose, 2 doses ou 10
5 doses por frasco.

Os dois frascos são embalados em conjunto. As caixas
contêm 1 frasco de cada componente (em frascos de dose
única ou em frascos multidoses) ou 100 frascos de cada
componente.

10 Para administração ao paciente, o material D-T-Pw-
HBsAg aquoso é puxado para uma seringa, e introduzido no
frasco de conjugado liofilizado. Após o material
liofilizado ser reativado, ele é colocado de volta para a
seringa através de uma agulha nova, para gerar uma vacina
15 pentavalente pronta para administração aos pacientes. Podem
ser usados vários esquemas de 3 doses de imunização
primária: 2, 4 e 6 meses; 3, 4 e 5 meses; ou 6, 10 e 14
semanas. A vacina também pode ser usada como reforço no
segundo ano de vida.

20 Os frascos de 10 doses geram material suficiente para
a imunização de 10 pacientes por um único frasco. A
reconstituição usa uma primeira seringa, e depois as doses
individuais são extraídas com seringas novas, uma dose por
seringa. Em um arranjo alternativo (menos preferido), as 10
25 doses são retiradas em uma única seringa, com a agulha
sendo trocada entre pacientes.

Será entendido que a invenção foi descrita somente
como exemplo, e que podem ser feitas modificações dentro do
escopo e do espírito da invenção.

30 REFERÊNCIAS

(cujos conteúdos são aqui incorporados por referência)

- [1] "Vaccines" (eds. Plotkin & Orenstein). 4ª edição, 2004
ISBN 0-7216-9688-0.
- [2] Patente U.S. 6.616.931.
- 5 [3] WO 02/055105.
- [4] US 2004/0048336.
- [5] "Nonionic Surfactants: Organic Chemistry". Nico M. van
Os, ed. ISBN: 0-824-79997-6.
- [6] Vanlandschoot e cols. (2005) *J. Gen. Virol.* 86:323-31.
- 10 [7] Hillman (1993) páginas 17-40 de "Hepatitis B vaccines
in clinical practice" ISBN 0-8247-8780.
- [8] Gerin e cols. (1969) *J. Virol.* 4: 763.
- [9] Gerin e cols. (1969) *J. Virol.* 7: 569.
- [10] Siebke e cols. (1972) *Acta Pathol. Microbiol. Scan.*
15 *sect. B*, 80: 935.
- [11] Pillot e cols. (1976) *J. Microbiol.* 4: 205.
- [12] Duimel & Krijnen (1972) *Vox Sang* 23: 249.
- [13] Neurath e cols. (1974) *PNAS USA* 71: 2.663.
- [14] Charm & Wong (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 16: 593.
- 20 [15] Patente U.S. 4.857.317.
- [16] Patente U.S. 4.683.294.
- [17] Houwen e cols. (1975) *J. Immunol. Methods* 8: 185.
- [18] Sitrin e cols. (1993) páginas 83-101 de "Hepatitis B
vaccines in clinical practice" ISBN 0-8247-8780-3.
- 25 [19] Wampler e cols. (1985) *PNAS USA* 82: 6.830-4.
- [20] Chi e cols. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 721: 365-73.
- [21] Agraz e cols. (1994) *J. Chromatogr. A* 672: 25-33.
- [22] Mason e cols. (1992) *PNAS USA* 89: 11.745-9.
- [23] Deml e cols. (1999) *J. Virol. Methods* 79: 205-17.
- 30 [24] Ibarra e cols. (1999) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci.*

- Appl. 735: 271-7.
- [25] WO 90/10058.
- [26] Pedido de Patente Japonesa JP 63239234.
- [27] Patente U.S. 4.694.074.
- 5 [28] EP-0341733.
- [29] Patente U.S. 5.242.812.
- [30] WO 02/12287.
- [31] Pedido de Patente Russa RU-2128707.
- [32] Hardy e cols. (2000) *J. Biotechnol.* 77: 157-67.
- 10 [33] Dogan e cols. (2000) *Biotechnol. Prog.* 16: 435-41.
- [34] WO 03/066094.
- [35] Rappuoli e cols. (1991) *TIBTECH* 9: 232-238.
- [36] Ramsay e cols. (2001) *Lancet* 357(9251): 195-196.
- [37] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl. 2: S28-36.
- 15 [38] Buttery & Moxon (2000) *J. R. Coll. Physicians Lond.*
34: 163-168.
- [39] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.*
13: 113-133, vii.
- [40] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47: 563-567.
- 20 [41] Patente européia 0477508.
- [42] Patente U.S. 5.306.492.
- [43] WO 98/42721.
- [44] "Conjugate Vaccines" (eds. Cruse e cols.) ISBN
3805549326, particularmente vol. 10: 48-114.
- 25 [45] Hermanson (1996) "Bioconjugate Techniques" ISBN:
0123423368 ou 012342335X.
- [46] WO 96/40242.
- [47] *WHO Tech. Rep. Ser.* 594: 51, 1976.
- [48] Zielén e cols. (2000) *Infect. Immun.* 68: 1.435-1.440.
- 30 [49] Darkes & Plosker (2002), *Paediatr. Drugs* 4: 609-630.

- [50] Watson (2000) *Pediatr. Infect. Dis.* 19: 331-332.
- [51] Rubin (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47: 269-285.
- [52] Jedrzejewski (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 187-207.
- 5 [53] Tettelin e cols. (2001) *Science* 293: 498-506.
- [54] Hoskins e cols. (2001) *J. Bacteriol.* 183: 5.709-5.717.
- [55] Rappuoli (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 445-450.
- [56] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19: 2.688-2691.
- [57] Masignani e cols. (2002) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2:
10 895-905.
- [58] Mora e cols. (2003) *Drug. Discov. Today.* 8: 459-464.
- [59] Wizemann e cols. (2001) *Infect. Immun.* 69: 1.593-1.598.
- [60] Rigden e cols. (2003) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*
15 38: 143-168.
- [61] WO 02/22167.
- [62] Mc Michael & Green (2003) *Curr. Opin. Investig. Drugs*
4: 953-8.
- [63] Módulo 6 de "WHO's The immunological basis for
20 immunization series" (Robertson).
- [64] WO 97/00697.
- [65] WO 02/00249.
- [66] Patente U.S. 6.013.264.
- [67] Patente U.S. 4.624.918.
- 25 [68] "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach"
(eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [69] WO 90/14837.
- [70] Patente U.S. 6.146.632.
- 30 [71] WO 99/11241.

- [72] WO 99/12565.
- [73] WO 98/56414.
- [74] Nony e cols. (2001) *Vaccine* 27: 3.645-51.
- [75] Anônimo (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453.077.
- 5 [76] Anderson (1983) *Infect. Immun.* 39(1): 233-238.
- [77] Anderson e cols. (1985) *J. Clin. Invest.* 76(1): 52-59.
- [78] EP-A-0372501.
- [79] EP-A-0378881.
- [80] EP-A-0427347.
- 10 [81] WO 93/17712.
- [82] WO 94/03208.
- [83] WO 98/58668.
- [84] EP-A-0471177.
- [85] WO 91/01146.
- 15 [86] Falugi e cols. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31: 3.816-24.
- [87] Baraldo e cols. (2004) *Infect. Immun.* 72: 4.884-87.
- [88] EP-A-0594610.
- [89] WO 00/56360.
- [90] WO 02/091998.
- 20 [91] Kuo e cols. (1995) *Infect. Immun.* 63: 2.706-13.
- [92] WO 01/72337.
- [93] WO 00/61761.
- [94] W02004/041157.
- [95] WO 91/18926 e Patentes U.S. 5.858.677, 5.888.517,
- 25 5.989.828, 6.025.484 e 6.139.846.
- [96] Janson e cols. (1991) *Infect. Immun.* 59: 119-25.
- [97] WO 00/56360.
- [98] Sesardic. E cols. (2001) *Biologicals* 29: 107-22.
- [99] Código NIBSC: 98/560.
- 30 [100] Módulo 1 de: "WHO's The immunological basis for

immunization series" (Galazka)

[101] Código NIBSC: 69/017.

[102] Código NIBSC: DIFT.

[103] Sesardice *cols.* (2002) *Biologicals*: 30 49-68.

5 [104] Código NIBSC: 98/552.

[105] Código NIBSC: TEFT.

[106] Código NIBSC: 66/303.

[107] Diminsky *e cols.* (1997) *Vaccine* 15: 637-47.

[108] Heijtink *e cols.* (2002) *Vaccine* 20: 2.191-6.

10 [109] Stargess *e cols.* (1999) *Vaccine* 17: 1.169-1.178.

[110] WO 93/24148.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de uma vacina combinada em que a vacina compreende: (i) um tensoativo não-iônico; (ii) um antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV), e (iii) um antígeno de pelo menos um patógeno não-HBV, e o processo caracterizado pelo fato de compreender: (i) a purificação do antígeno de superfície do HBV por células de levedura recombinantes, em que a purificação inclui uma etapa na qual as células de levedura são rompidas na presença do tensoativo não-iônico, para gerar um componente de HBsAg purificado; e (ii) a combinação do componente de HBsAg purificado com pelo menos um antígeno adicional de um patógeno não-HBV, para gerar a vacina combinada.

2. Processo para a preparação de uma vacina combinada, em que a vacina compreende: (i) um tensoativo não-iônico, (ii) um antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV) (HBsAg), e (iii) um antígeno de pelo menos um patógeno não-HBV, e o processo caracterizado pelo fato de compreender a etapa de combinação de um HBsAg purificado com pelo menos um antígeno adicional de um patógeno não-HBV, para gerar a vacina combinada, em que o HBsAg foi preparado por um processo no qual células de levedura recombinantes que expressam HBsAg foram rompidas na presença do tensoativo não-iônico.

3. Composição imunogênica caracterizada pelo fato de compreender (i) um tensoativo não-iônico, (ii) um antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV), e (iii) um antígeno de pelo menos um patógeno não-HBV, em que o antígeno de superfície do HBV foi preparado por um processo

em que células de levedura recombinantes que expressam HBsAg foram rompidas na presença do tensoativo não-iônico.

4. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 3, caracterizada pelo fato de que o tensoativo não-iônico inclui resíduos de poli(oxieteno).

5. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o tensoativo não-iônico é um éster de polioxietileno sorbitano.

10 6. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o tensoativo não-iônico é polissorbato 20.

7. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que o tensoativo não-iônico está presente no produto final a $\leq 30 \mu\text{g/ml}$.

8. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que o tensoativo não-iônico está presente no produto final a $\leq 50 \mu\text{g}$ para cada $100 \mu\text{g}$ de HBsAg.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que: (i) pelo menos um patógeno não-HBV inclui *C. diphteriae* e *C. tetani*; (ii) os antígenos desses dois patógenos são um toxóide diftérico e um toxóide tetânico; e (iii) os toxóides diftéricos e tetânicos estão inicialmente presentes na forma misturada que é substancialmente livre de polissorbato 20.

10. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9,

caracterizada pelo fato de que o antígeno de superfície do HBV é não glicosilado.

11. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que o antígeno de superfície do HBV está na forma de partículas que incluem uma matriz lipídica que compreende fosfolipídeos.

12. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizada pelo fato de que o antígeno de superfície do HBV é de HBV do subtipo adw2.

13. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12, caracterizada pelo fato de que o antígeno de superfície do HBV está presente na composição final a cerca de 10 µg por dose.

14. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13, caracterizada pelo fato de que a vacina inclui um conjugado de Hib, um conjugado meningocócico e/ou um conjugado pneumocócico.

15. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que a composição final é selecionada de: uma composição trivalente HBsAg, D, T; uma composição tetravalente HBsAg, D, T, Pw; uma composição pentavalente HBsAg, D, T, Pw, Hib; uma composição heptavalente HBsAg, D, T, Pw, Hib, MenA, MenC; uma composição octavalente HBsAg, D, T, Pw, Hib, MenA, MenC, MenW135; uma composição octavalente HBsAg, D, T, Pw, Hib,

MenA, MenC, MenY; uma composição nonavalente HBsAg, D, T, Pw, Hib, MenA, MenC, MenW135, MenY; uma composição tetravalente HBsAg, D, T, Pa; uma composição pentavalente HBsAg, D, T, Pa, Hib; uma composição pentavalente HBsAg, D, T, Pa, poliovírus; uma composição hexavalente HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib; uma composição heptavalente HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC; uma composição octavalente HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC, MenA; uma composição octavalente HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC, MenY; uma composição octavalente HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC, MenW135; uma composição decavalente HBsAg, D, T, Pa, poliovírus, Hib, MenC, MenA, MenW135, MenY; uma composição bivalente HBsAg, Hib; e uma composição bivalente HBsAg, vírus da hepatite A.

15 16. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, caracterizada pelo fato de que a composição final inclui um adjuvante de fosfato de alumínio e/ou um adjuvante de hidróxido de alumínio.

20 17. Processo ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizada pelo fato de que a composição final inclui adjuvantes tanto de fosfato de alumínio quanto de hidróxido de alumínio.

25 18. Processo ou composição, de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizada pelo fato de que a concentração de Al^{3+} na composição final é ≤ 5 mg/ml.

30 19. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o

processo compreende a adição de um componente pré-misturado de D-T.

20. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 5 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que o processo compreende a adição de um componente pré-misturado de D-T-Pw.

21. Processo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o componente pré-misturado 10 de D-T-Pw inclui adjuvantes tanto de fosfato de alumínio quanto de hidróxido de alumínio.

22. Uso de (i) HBsAg purificado por células de levedura recombinantes, em que o processo de purificação envolve a ruptura das células de levedura na presença de 15 tensoativo não-iônico, e (ii) um ou mais antígenos não-HBV caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para administração a um paciente

23. Kit para a preparação de uma composição pentavalente caracterizado pelo fato de que: a composição 20 pentavalente compreende antígenos HBsAg, D, T, Pw e um conjugado de Hib-T; os antígenos D e T são adsorvidos ao um adjuvante de hidróxido de alumínio; o HBsAg e Hib-T são adsorvidos a um adjuvante de fosfato de alumínio; os componentes de HBsAg, D, T e Pw estão em forma aquosa em um 25 primeiro recipiente; o Hib-T está em forma liofilizada em combinação com lactose em um segundo recipiente, e o HBsAg foi preparado por um processo em que células de levedura recombinantes que expressam HBsAg foram rompidas na presença do tensoativo não-iônico.

30 24. Kit para a preparação de uma composição

heptavalente caracterizado pelo fato de que: a composição heptavalente compreende HBsAg, D, T, Pw, um conjugado de Hib-T, um conjugado de MenA e um conjugado de MenC; os componentes de HBsAg, D, T e Pw estão em forma aquosa em um primeiro recipiente; os três conjugados estão na forma liofilizada em um segundo recipiente; o primeiro recipiente também inclui adjuvantes tanto de hidróxido de alumínio quanto de fosfato de alumínio, em que os antígenos D e T são adsorvidos ao hidróxido de alumínio e o HBsAg é adsorvido ao fosfato de alumínio; e o HBsAg foi preparado por um processo em que células de levedura recombinantes que expressam HBsAg foram rompidas na presença do tensoativo não-iônico.

25. Kit, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o primeiro recipiente adicionalmente inclui timerosal.

FIGURA 1A

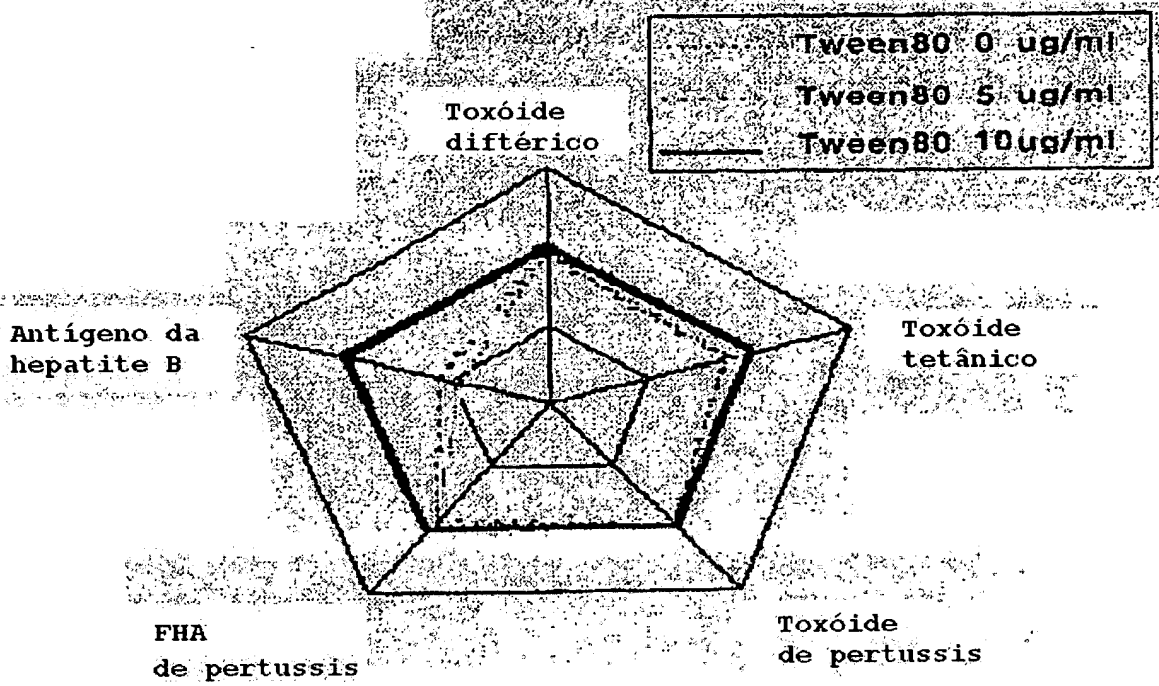


FIGURA 1b

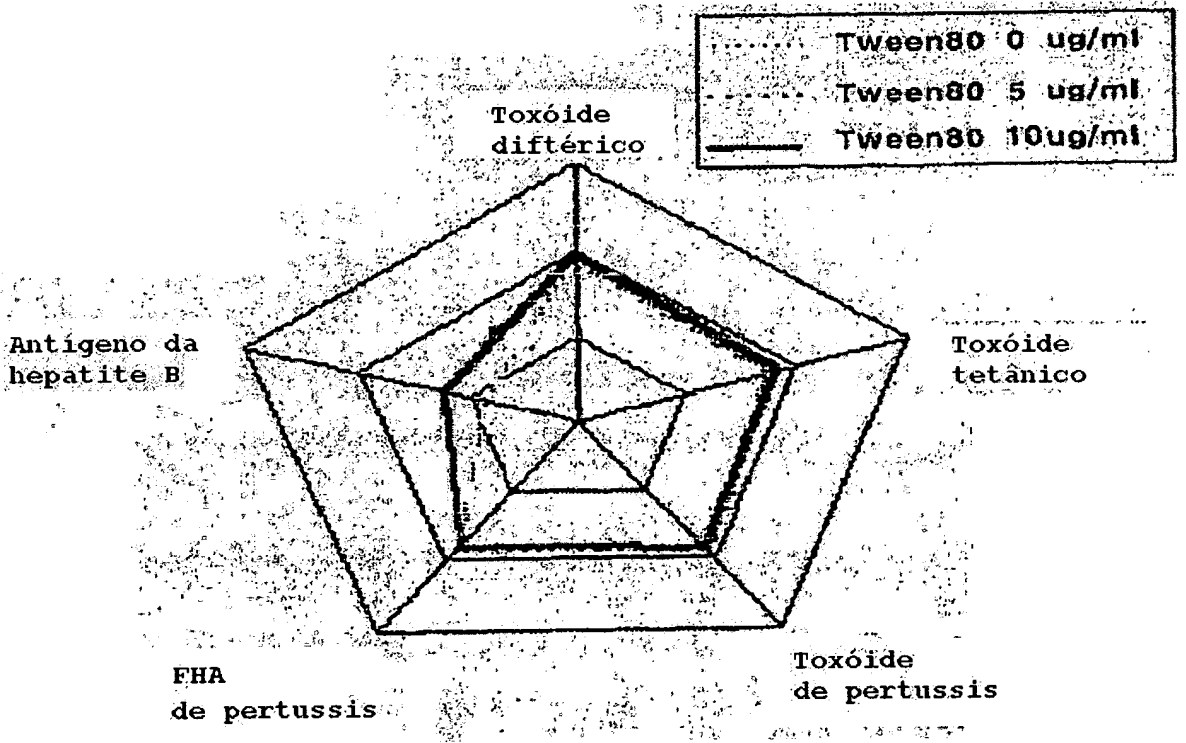


FIGURA 1C

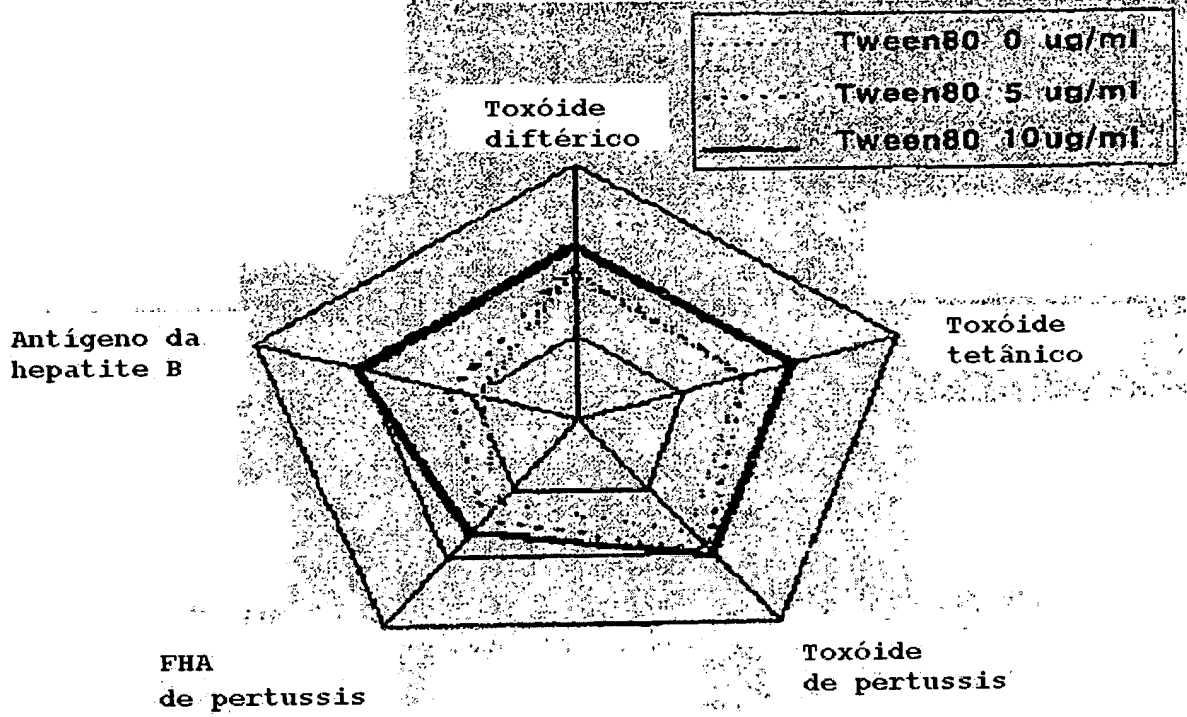


FIGURA 1D

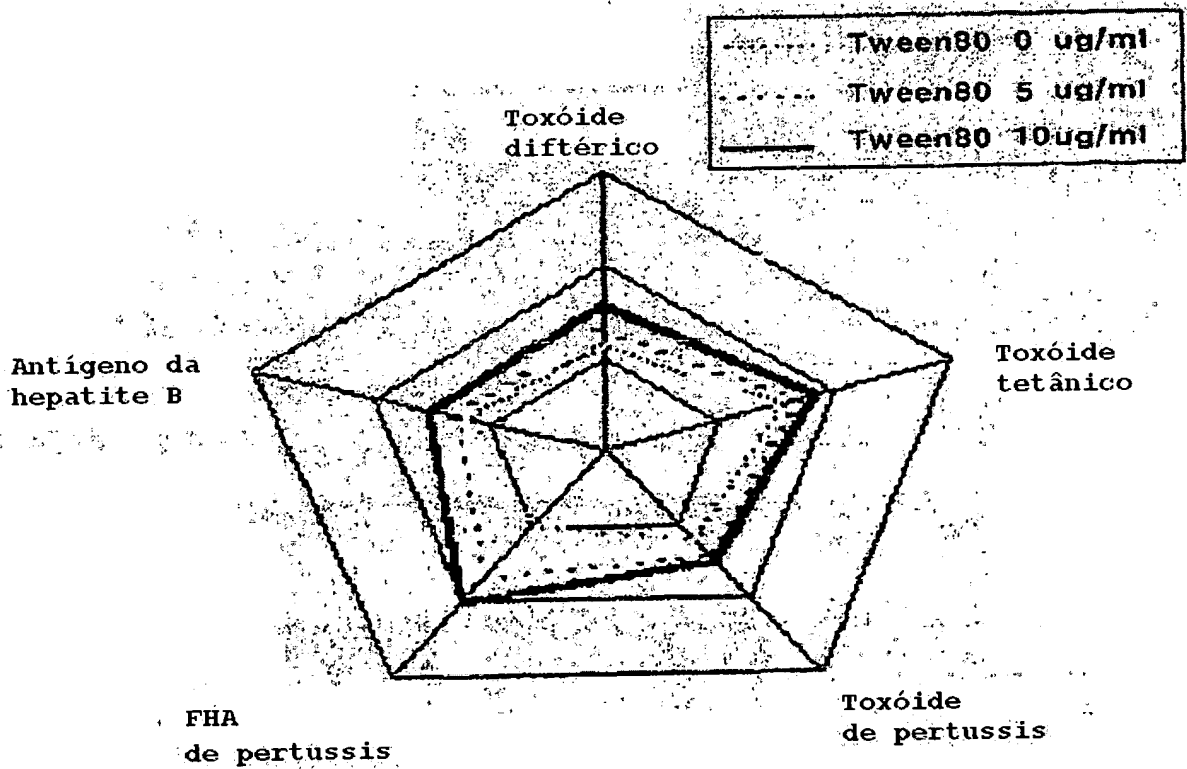


FIGURA 2

FIGURA 2A

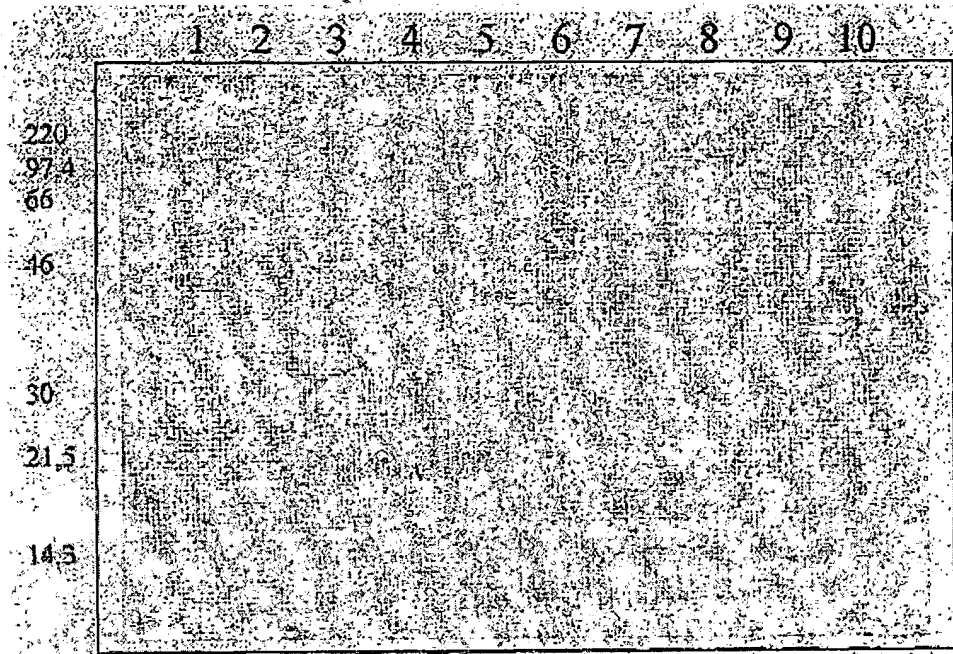


FIGURA 2B

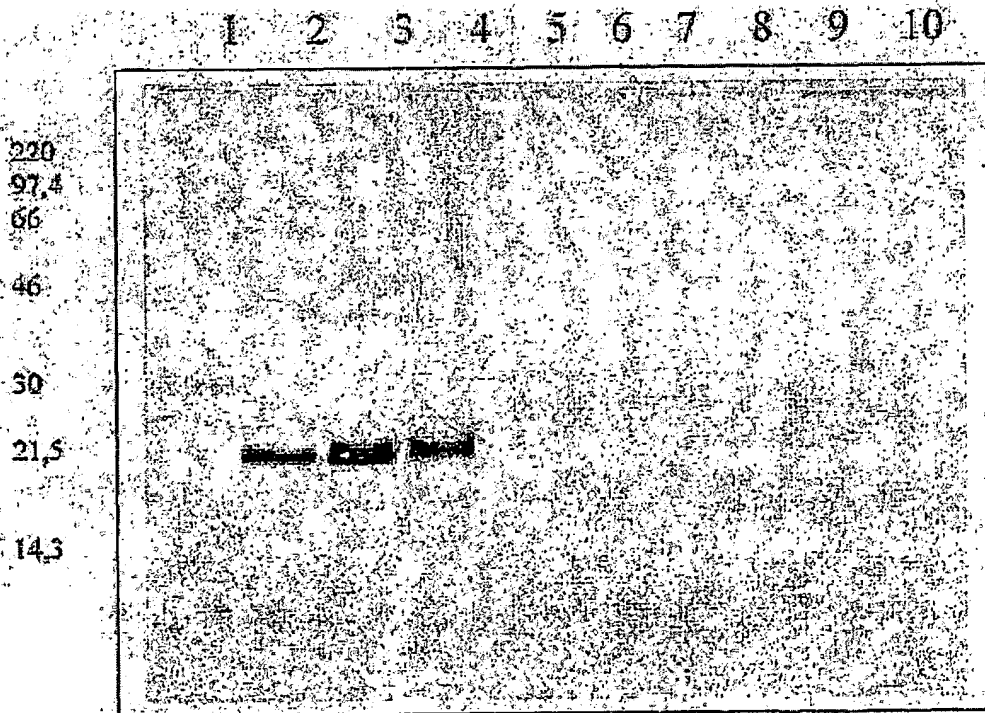


FIGURA 2C

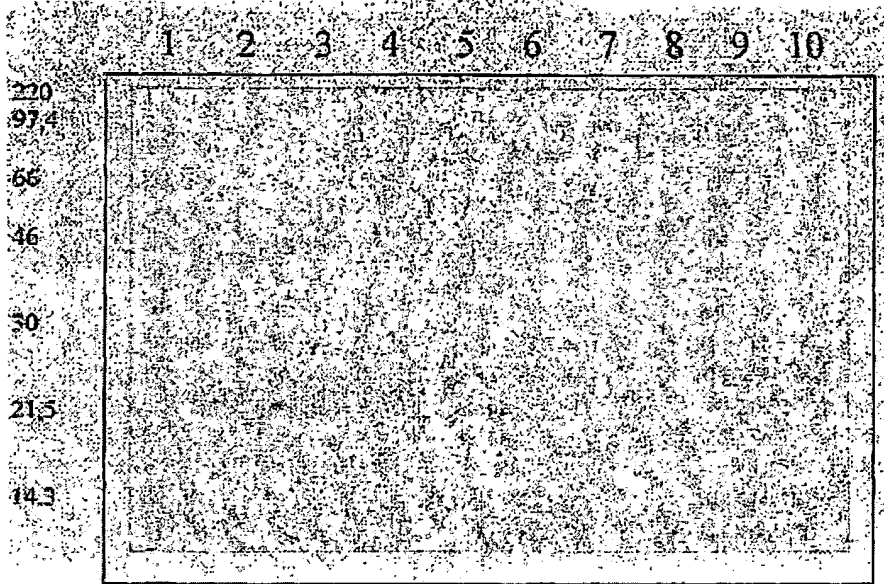


FIGURA 2D

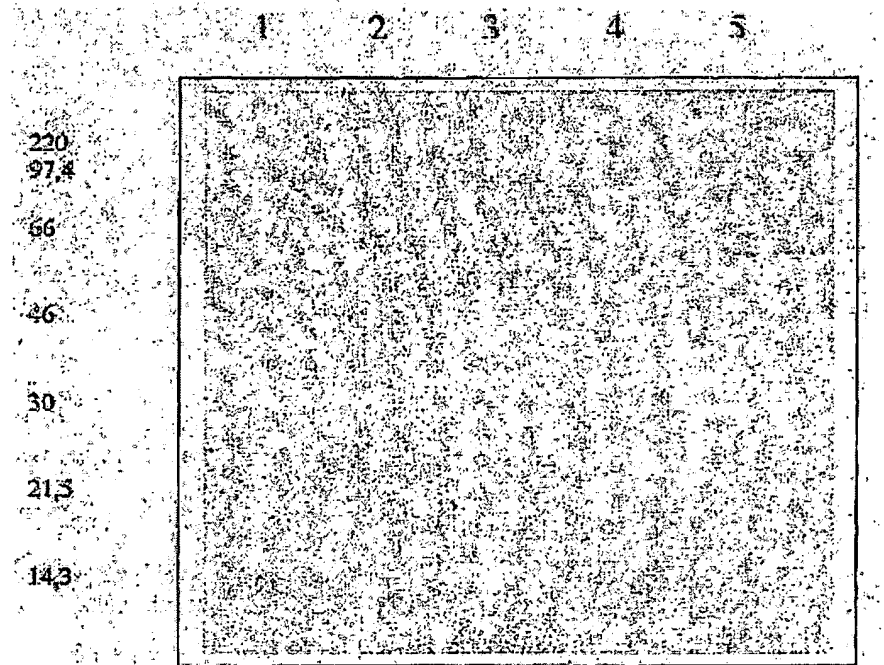


FIGURA 3

FIGURA 3A

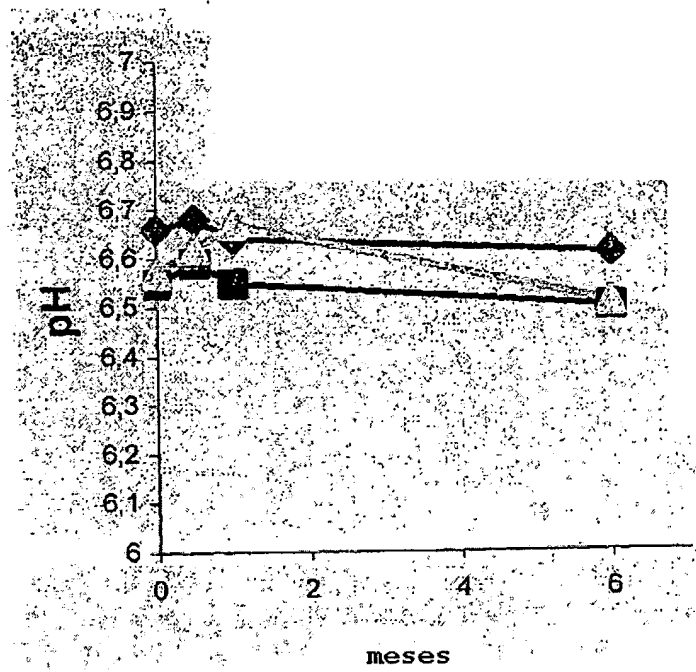


FIGURA 3B

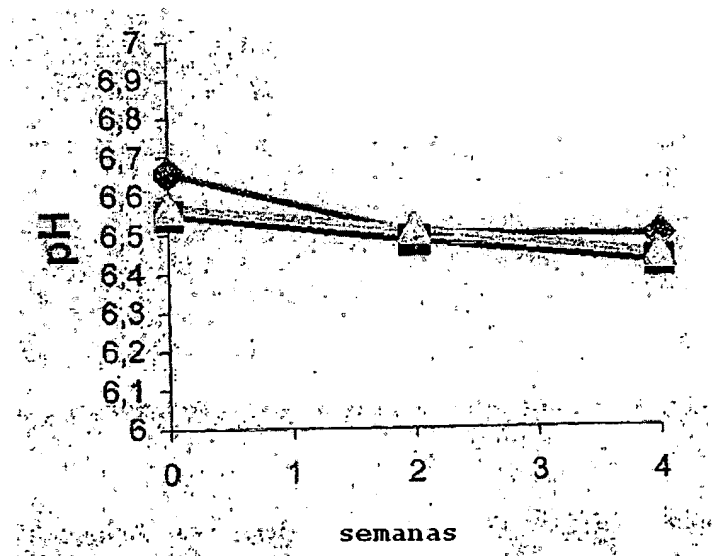


FIGURA 4

FIGURA 4A

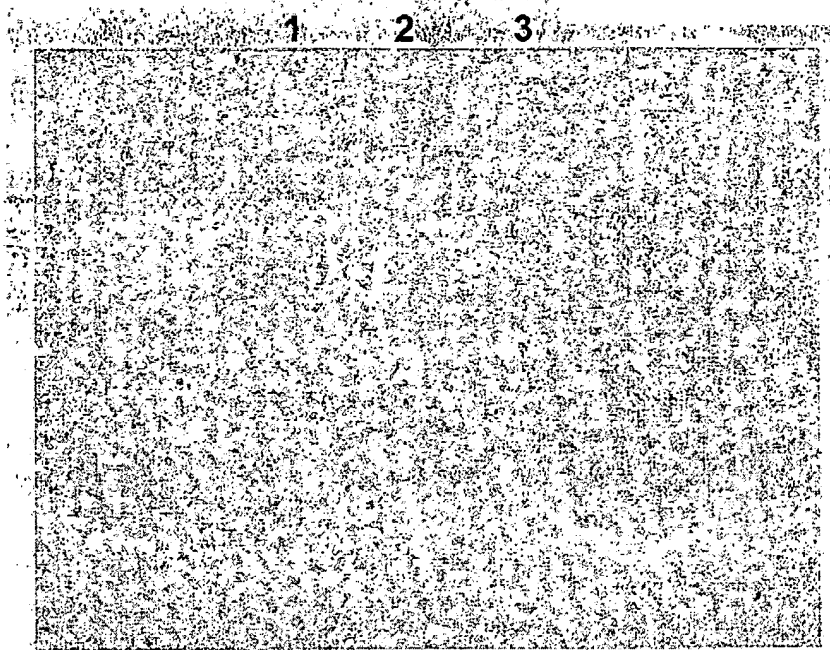
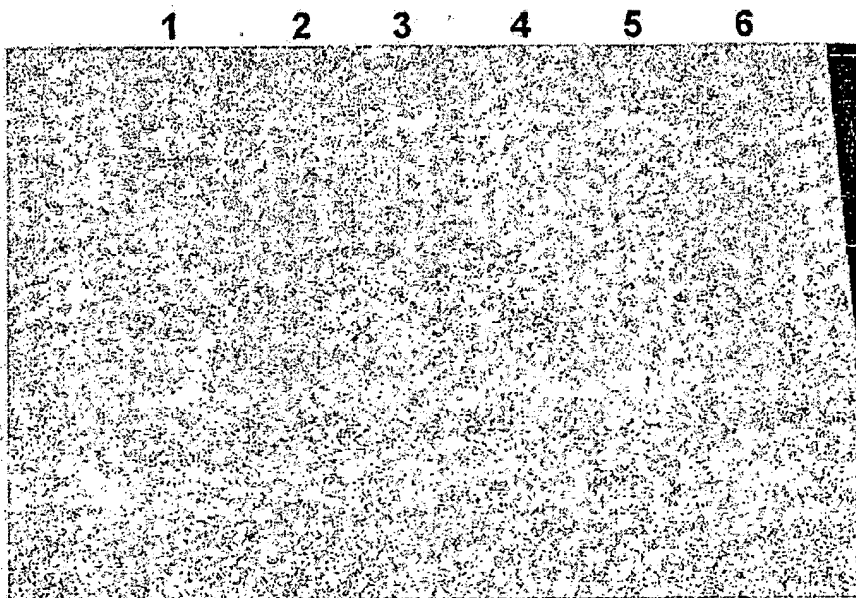


FIGURA 4B



**FABRICAÇÃO DE VACINAS QUE CONTÊM ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE DO
VÍRUS DA HEPATITE B E TENSOATIVO**

Durante a preparação de HBsAg para uso em uma vacina combinada, normalmente se adiciona um detergente não-iônico após o HBsAg ter sido purificado. No entanto, a adição de detergentes após a purificação do HBsAg não é ideal, na medida em que ela exige uma etapa de processamento separada durante a fabricação. Dessa forma, a invenção os utiliza durante a purificação do HBsAg.