



(11) PI 0618094-9 B1

(22) Data do Depósito: 01/11/2006

(45) Data de Concessão: 11/07/2023

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(54) Título: MÉTODO PARA PREPARAR UM PRODUTO DE CULTURA DE CÉLULA

(51) Int.Cl.: A61K 39/12; A61K 39/145.

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2005 US 60/732.786.

(73) Titular(es): SEQIRUS UK LIMITED.

(72) Inventor(es): JENS-PETER GREGERSEN; HOLGER KOST.

(86) Pedido PCT: PCT IB2006003880 de 01/11/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/052163 de 10/05/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/04/2008

(57) Resumo: VACINAS VIRAIS DERIVADAS DE CÉLULAS COM NÍVEIS BAIXOS DE DNA RESIDUAL DE CÉLULA A presente invenção se refere aos produtos de vacina para o tratamento ou prevenção das infecções virais. São providos adicionalmente métodos para redução dos contaminantes associados à preparação das vacinas de culturais. O DNA residual da cultura de célula funcional é degradado por tratamento com um agente alquilante de DNA, tal como (Beta)-propiolactona (BPL), pelo que provendo uma vacina compreendendo proteínas imunogênicas derivados de um vírus propagado na cultura de célula, substancialmente isenta de DNA residual de cultura de célula funcional.

MÉTODO PARA PREPARAR UM PRODUTO DE CULTURA DE CÉLULA

[001] Todos os documentos e informações on-line citadas aqui são incorporadas como referência em sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO

[002] A invenção provê produtos e processos aperfeiçoados de cultura de célula com impurezas reduzidas. Especificamente, a invenção provê um método aperfeiçoado para degradação de qualquer DNA residual de cultura de célula funcional permanecendo associado ao produto gerado da cultura de célula. De acordo com a invenção, o DNA residual de cultura de célula funcional é degradado por tratamento com um agente alquilante de DNA, tal como β -propiolactona (BPL). Esse processo pode ser usado para tratar uma faixa de produtos de cultura de célula incluindo vacinas e proteínas recombinantes.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[003] A produção comercial de vacinas virais requer, tipicamente, grandes quantidades de vírus como uma fonte de antígenos. Quantidades comerciais de vírus para produção de vacinas podem ser obtidas por cultura e replicação de um vírus semente em um sistema de cultura de célula. Sistemas de cultura de célula apropriados para replicação viral incluem células de mamíferos, aves ou insetos, porém os sistemas de cultura de célula de mamíferos são especificamente preferidos para vacinas virais de modo a garantir a glicosilação apropriada e dobra das proteínas de antígenos dos vírus. Por razões semelhantes, os sistemas de cultura de célula de mamíferos são também preferidos para expressão da proteína recombinante.

[004] Se não modificadas de seus estados ocorrendo

naturalmente, as culturas de células possuem uma capacidade limitada de reprodução e subsequentemente são impraticáveis e ineficientes para produção da quantidade de material necessária para a vacina comercial ou proteína recombinante. Consequentemente, para fins de fabricação, é preferido que a células sejam modificadas para serem linhagens de célula "contínuas" ou "imortalizadas", de modo a aumentarem o número de vezes que elas podem ser dividir. Muitas dessas modificações empregam mecanismos semelhantes aos que estão implicados nas células oncogênicas. Como tal, existe uma questão que quaisquer materiais residuais dos processos de cultura de célula, tais como, DNA da célula hospedeira sejam removidos da formulação final de um produto de vacina ou de proteína recombinante fabricado nesses sistemas.

[005] Um modo padrão para remoção do DNA residual da célula hospedeira é por tratamento com DNase. Um método conveniente desse tipo é revelado na Patente Européia 0870508 e Patente US 5948410, envolvendo um tratamento de duas etapas, primeiro o uso de uma DNase (por exemplo, benzonase) e então um detergente catiônico (por exemplo, CTAB).

[006] Esforços correntes para reduzir esse risco focaram a redução da concentração total de DNA residual da célula hospedeira. É um objetivo da presente invenção reduzir o risco adicional por eliminação da funcionalidade de qualquer DNA remanescente da célula hospedeira.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] A invenção provê produtos e processos de cultura de célula aperfeiçoados com impurezas reduzidas.

Especificamente, a invenção provê um método aperfeiçoado para degradação de qualquer DNA residual de cultura de célula funcional permanecendo associado ao produto gerado da cultura de célula. De acordo com a invenção, o DNA residual de cultura de célula funcional é degradado por tratamento com um agente alquilante de DNA, tal como β -propiolactona (BPL). Esse processo pode ser usado para tratar uma faixa de produtos de cultura de célula incluindo vacinas e proteínas recombinantes.

[008]A invenção inclui uma vacina compreendendo proteínas imunogênicas derivadas de um vírus propagado na cultura de célula, onde a vacina é substancialmente isenta de DNA residual de cultura de célula funcional. Além disso, a invenção se refere às proteínas recombinantes expressas na cultura de célula, onde a formulação final da proteína recombinante é substancialmente isenta de DNA residual de cultura de célula funcional.

[009]A funcionalidade de qualquer DNA residual de célula hospedeira pode ser eliminada por tratamento do DNA com um agente alquilante que cliva o DNA em porções pequenas o suficiente, de modo que ele é incapaz de codificar uma proteína funcional, a ser transportada para o interior de um cromossoma de paciente humano, ou de outra forma de ser reconhecida pela maquinaria de replicação de DNA do receptor. Preferivelmente, o comprimento do DNA residual de cultura de célula degradado é inferior a 500 pares de base. Mais preferivelmente, o comprimento do DNA residual de cultura de célula degradado é inferior a 200 pares de base.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0010] A invenção provê produtos de cultura de célula e processos aperfeiçoados com impurezas reduzidas. Especificamente, a invenção provê um método aperfeiçoado para degradação de qualquer DNA residual de cultura de célula funcional permanecendo associado ao produto gerado da cultura de célula. De acordo com a invenção, o DNA residual de cultura de célula funcional é degradado por tratamento com um agente alquilante de DNA, tal como β -propiolactona (BPL). Esse processo pode ser usado para tratar uma faixa de produtos de cultura de célula incluindo vacinas e proteínas recombinantes.

[0011] A invenção inclui uma vacina compreendendo proteínas imunogênicas derivadas de um vírus propagado na cultura de célula, onde a vacina é substancialmente isenta de DNA residual de cultura de célula funcional. Além disso, a invenção se refere às proteínas recombinantes expressas na cultura de célula, onde a formulação final da proteína recombinante é substancialmente isenta de DNA residual de cultura de célula funcional.

[0012] A funcionalidade de qualquer DNA residual de célula hospedeira pode ser eliminada por tratamento do DNA com um agente alquilante que cliva o DNA em porções pequenas o suficiente para serem incapazes de codificar uma proteína funcional, a ser transportada para o interior de um cromossoma de paciente humano, ou de outra forma de ser reconhecida pela máquina de replicação de DNA do receptor. O comprimento do DNA residual de cultura de célula degradado (não funcional) é preferivelmente inferior a 1,000 pares de base (por exemplo, inferior a 1,000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, ou 50 pares de

base). Preferivelmente, o comprimento do DNA residual de cultura de célula degradado é inferior a 500 pares de base. Mais preferivelmente, o comprimento do DNA residual de cultura de célula degradado é inferior a 200 pares de base.

[0013] Conforme usado aqui, a referência ao "DNA funcional" ou "RNA funcional" indica uma sequência nucleotídica capaz de ser traduzida em uma proteína funcional ou transposta para um cromossoma de mamífero. De modo geral, sequências nucleotídicas capazes de serem traduzidas em uma proteína funcional requerem regiões promotoras, códons de partida, códons de parada e sequências de codificação internas para proteínas funcionais. Quando ocorre lesão ao DNA, como da adição de um agente alquilante, muitas dessas regiões são alteradas ou destruídas, tal que a tradução pode prosseguir mais lentamente ou apenas prosseguir para formar uma subunidade de oligopeptídeo da proteína pretendida.

[0014] "DNA residual de cultura de célula degradado funcional" se refere ao DNA funcional que não pode ser traduzido em uma proteína funcional ou ser transportado para um cromossoma de mamífero. Preferivelmente, "DNA residual funcional degradado" possui um comprimento inferior a 1,000 pares de base, mais preferivelmente inferior a 500 pares de base, mesmo mais preferivelmente inferior a 250 pares de base, e mais preferivelmente inferior a 100 pares de base. O comprimento do DNA residual funcional degradado pode ser determinado por técnicas padrão, incluindo eletroforese de gel.

[0015] A invenção provê composições de vacina e formulações de proteína recombinante que são

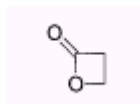
substancialmente isentas de DNA residual de cultura de célula funcional. Conforme usado aqui, substancialmente isenta de DNA residual de cultura de célula funcional se refere a uma composição ou formulação onde fragmentos de DNA residual inferiores a 200 pares de base são detectáveis em menos de 10 ng por 0,5 mL. O tamanho de qualquer DNA residual de cultura de célula pode ser medido por técnicas padrão, incluindo eletroforese do gel por capilaridade e tecnologia de ampliação de ácido nucléico.

[0016] O emprego de um agente alquilante tal como BPL na invenção provê o benefício adicional de reduzir agregação e contaminantes. Formulações de vacina com agregados reduzidos podem também possuir imunogenicidade melhorada. A imunogenicidade de uma vacina se fixa na especificidade dos anticorpos para epítomos virais específicos. Se a superfície de uma proteína estiver ligada ou mascarada por moléculas indesejadas ou impedida através de agregação em macromoléculas maiores, os epítomos podem ser tornar menos reconhecíveis e, portanto, menos eficazes em uma vacina. Além disso, as formulações de vacina com agregados reduzidos podem possuir vantagens de processamento adicionais. Os processos de purificação se fiam no isolamento da proteína esperada, por exemplo, hemaglutinina e neuraminidase em uma vacina contra *Influenza*. Se a proteína for estruturalmente modificada pela presença de agregados ou reticulação, ela pode não ser reconhecida e subsequentemente ser removida por cromatografia de coluna, filtração e centrifugação.

Agentes alquilantes.

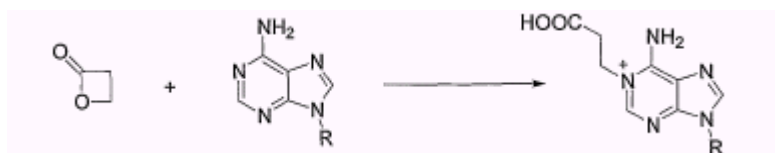
[0017] Os agentes alquilantes para emprego na

invenção incluem substâncias que introduzem um radical alcalino no composto. Preferivelmente, o agente alquilante é um agente monoalquilante, tal como BPL. A BPL é um agente monoalquilante amplamente empregado para inativação dos vírus na preparação de muitas vacinas. A BPL reage com várias moléculas biológicas incluindo ácidos nucleicos onde ele causa modificação estrutural por alquilação e depuração. A BPL é geralmente representada pela seguinte estrutura:



[0018] A BPL, *in vitro*, reage de modo geral com os nucleófilos presentes em altas concentrações, sob condições favoráveis para reações de substituição nucleófila - como em vapor alto, concentrações altas de BPL e solventes polares apróticos - para formar ácidos propiônicos funcionalizados, tais como, 7-(2-carbóxi-2-etil)guanina ou 1-(2-carbóxi-2-etil)desoxiadenosina (Esquema 1). Boutwell e outros, *Annals New York Academy of Sciences*, 751-764; Perrin e outros, *Biologicals*, 23 (1995) 207-211; Chen e outros, *Carcinogenesis*, 2(2) (1981) 73-80.

Esquema 1 (de Chen e outros):



BPL, desoxiadenosina, 1-(2-carbóxi-2-etil)desoxiadenosina

[0019] Tal ligação ou alquilação das bases de DNA induz mutagenicidade por vários mecanismos incluindo substituições de pares de base, especialmente depuração,

deleções e reticulação dos nucleosídeos. O alto grau de mutagenicidade e reatividade de BPL corresponde ao extermínio rápido dos vírus e degradação de DNA subsequente em subprodutos não carcinogênicos.

[0020] Qualquer DNA residual de cultura de célula funcional é degradado por tratamento com menos de 1% BPL (por exemplo, menos de 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,2%, 0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,025%, 0,01% ou 0,005%). Preferivelmente, o DNA residual de cultura de célula funcional é degradado por tratamento com entre 0,1% e 0,01% de BPL.

[0021] O agente alquilante é preferivelmente adicionado a uma solução tamponada e o pH da solução é preferivelmente mantido entre 5 e 10. Mais preferivelmente o pH da solução é mantido entre 6 e 9. Mesmo mais preferivelmente o pH da solução é mantido entre 7 e 8.

[0022] Em alguns métodos, o agente alquilante é adicionado mais de uma vez. Por exemplo, um primeiro tratamento com BPL pode ser realizado e então um segundo tratamento com BPL pode ser realizado. Entre o primeiro e o segundo tratamentos pode haver uma etapa de remoção de agente alquilante, porém o agente alquilante pode ser adicionado a um segundo tratamento, sem remoção de qualquer agente alquilante que permaneça do primeiro tratamento.

[0023] Preferivelmente, o agente alquilante também é usado como agente de inativação para o vírus usado na vacina. Os agentes alquilantes da invenção são preferidos em relação aos agentes de inativação tradicionais, tais como, aldeído fórmico, que pode reticular as proteínas em outro material, incluindo DNA de célula hospedeira. Tal reticulação pode conduzir à formação de agregados (tais

como, conglomerados de proteína-proteína, combinações de nucleotídeo e combinações de proteína-nucleotídeo). Em razão dos agentes alquilantes, tais como BPL, não se fiarem em tais mecanismos de reticulação para inativação viral, o uso de tais agentes alquilantes para inativação viral, o uso de tais agentes alquilantes para inativação viral minimiza a formação de agregados e outras impurezas no produto de vacina. Tais agregados podem compreender proteínas ligadas iônica ou covalentemente às outras proteínas, proteínas iônica ou covalentemente ligadas aos outros nucleotídeos e/ou nucleotídeos iônica ou covalentemente ligados aos outros nucleotídeos.

[0024] Conforme usado aqui, a referência à "agregação" ou "um agregado" indica uma massa ou corpo de unidades individuais ou partículas ligadas em conjunto para criar grupos maiores ou partículas. A agregação pode ser, de modo geral, determinada por medições quantitativas dos componentes desejados e após uma etapa de agregação possível ou antes e após aplicação de um método de interrupção do agregado (por exemplo, por tratamento com detergente) por eletroforese de gel (tal como sistema de Laemmli), cromatografia, turbidez da solução ou estudos de sedimentação e outros métodos bem conhecidos na arte.

[0025] O tratamento com o agente alquilante, especificamente com BPL, pode envolver fases com temperaturas diferentes. Por exemplo, pode haver uma primeira fase em uma temperatura baixa (por exemplo, entre 2-8°C, tal como cerca de 4°C) e uma segunda fase em uma temperatura mais alta, tipicamente pelo menos 10°C maior que a primeira fase (por exemplo, entre 25-50°C, tal como

cerca de 37°C). Esse processo de duas fases é especificamente útil quando o agente alquilante está sendo usado para ambas inativação e degradação do DNA. Em um esquema típico, a inativação do vírus ocorre durante a fase de temperatura inferior e a degradação do DNA ocorre durante a fase de temperatura mais alta. Conforme descrito em maiores detalhes a seguir, uma temperatura aumentada pode também facilitar a remoção do reagente de alquilação sensível ao aquecimento.

Proteínas imunogênicas

[0026] As proteínas imunogênicas apropriadas para emprego na invenção podem ser derivadas de quaisquer vírus que seja o alvo de uma vacina. As proteínas imunogênicas podem ser formuladas como vírus inativado (ou exterminado), vírus atenuado, formulações de vírus dividido, formulações de subunidade purificada, proteínas virais que são isoladas, purificadas ou derivadas de um vírus e partículas semelhantes a vírus (VLPs).

[0027] As proteínas imunogênicas da invenção são antígenos virais que preferivelmente incluem epítomos que são expostos à superfície do vírus durante pelo menos um estágio de seu ciclo de vida. Os antígenos virais são preferivelmente conservados através de múltiplos sorotipos ou isolados. Os antígenos virais incluem antígenos derivados de um ou mais dos vírus estabelecidos a seguir, bem como os antígenos específicos identificados a seguir. Os vírus podem estar em envoltórios ou não, preferivelmente em envoltórios. Os vírus são preferivelmente RNA vírus e, mais preferivelmente RNAss vírus. Eles podem ter um genoma de sentido ou preferivelmente um genoma de anti-sentido.

Seus genomas podem ser não segmentados ou preferivelmente segmentados.

[0028] *Orthomyxovirus*: Antígenos virais podem ser derivados de um *Orthomyxovirus*, tal como *Influenza A*, *B* e *C*. Os antígenos do *Orthomyxovirus* antígenos podem ser selecionados de uma ou mais das proteínas virais, hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína da membrana (M2), um ou mais dos componentes da transcriptase (PB1, PB2 e PA). Os antígenos preferidos incluem HA e NA.

[0029] Antígenos de *Influenza* podem ser derivados de cepas de *Influenza*. Alternativamente antígenos para *Influenza* podem ser derivados de cepas com potencial para causar surto pandêmico (isto é, cepas de *Influenza* com nova hemaglutinina em comparação a uma hemaglutinina nas cepas circulando correntemente ou cepas de *Influenza* que são patogênicas em aves e possuem o potencial de serem transmitidas horizontalmente na população humana ou cepas de *Influenza* que são patogênicas aos seres humanos). Dependendo da estação específica e da natureza do antígeno incluído na vacina, os antígenos de *Influenza* podem ser derivados de um ou mais dentre os subtipos de hemaglutinina que se seguem: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 ou H16.

[0030] Os antígenos de *Influenza* da invenção podem ser derivados de uma cepa de *Influenza*, especificamente uma cepa *Influenza* aviário altamente patogênica (HPAI). Alexander, *Avian Dis* (2003) 47(3 Suppl):976-81).

[0031] Detalhes adicionais dos antígenos do vírus

Influenza são fornecidos a seguir.

[0032] *Vírus Paramyxoviridae*: Os antígenos virais podem ser derivados do vírus *Paramyxoviridae*, tais como Pneumovírus (RSV), Paramyxovírus (PIV) e Morbillivírus (sarampo).

[0033] *Pneumovirus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Pneumovírus, tal como Vírus Sincicial Respiratório (RSV), vírus Sincicial Respiratório Bovino, vírus da Pneumonia de camundongos e vírus de rinotraqueíte de perus. Preferivelmente, o Pneumovírus é RSV. Os antígenos para o Pneumovírus podem ser selecionados de uma ou mais das proteínas que se seguem, incluindo proteínas de fusão de superfície (F), glicoproteína (G) e proteína hidrófoba pequena (SH), proteínas de matriz M e M2, proteínas de nucleocapsídeo N, P e L e proteínas não estruturais NS1 e NS2. Antígenos para Pneumovírus preferidos incluem F, G e M. Vide por exemplo, *J Gen Virol.* 2004 Nov; 85(Pt 11):3229). Os antígenos para Pneumovírus podem também ser formulados em ou derivados de vírus quiméricos. Por exemplo, vírus quiméricos RSV/PIV podem compreender componentes de ambos RSV e PIV.

[0034] *Paramyxovírus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Paramyxovírus, tal como vírus *Parainfluenza* tipos 1 - 4 (PIV), Caxumba, vírus Sendai, vírus de símios 5, vírus parainfluenza bovino e vírus da doença de Newcastle. Preferivelmente, o Paramyxovírus é PIV ou de Caxumba. Os antígenos para Paramyxovírus podem ser selecionados de uma ou mais das proteínas que se seguem: Hemaglutinina-Neuraminidase (HN), Proteínas de

fusão F1 e F2, Nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína grande (L) e proteína de matriz (M). As proteínas de Paramyxovírus preferidas incluem HN, F1 e F2. Antígenos para Paramyxovírus também podem ser formulados ou derivados de vírus quiméricos. Por exemplo, vírus quiméricos RSV/PIV podem compreender componentes de ambos RSV e PIV. Vacinas para caxumba disponíveis comercialmente incluem vírus da caxumba atenuado, vivo em uma forma monovalente ou em combinação com vacinas para sarampo e rubéola (MMR).

[0035] *Morbillivírus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Morbillivírus, tal como Sarampo. Os antígenos para Morbillivírus podem ser selecionados de uma ou mais das seguintes proteínas: hemaglutinina (H), Glicoproteína (G), fator de fusão (F), proteína grande (L), Nucleoproteína (NP), Polimerase fosfoproteína (P) e Matriz (M). Vacinas para sarampo disponíveis comercialmente incluem vírus do sarampo atenuado, vivo, tipicamente em combinação com caxumba e rubéola (MMR).

[0036] *Picornavírus*: Os antígenos virais podem ser derivados de Picornavírus, tais como, Enterovírus, Rinovírus, Heparnavírus, Cardiovírus e Aftovírus. Os antígenos derivados de Enterovírus, tal como Poliovírus são preferidos.

[0037] *Enterovírus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Enterovírus, tal como, Poliovírus tipos 1, 2 ou 3, vírus Coxsackie tipos 1 a 22 e 24, vírus Coxsackie B tipos 1 a 6, Echovírus (vírus ECHO) tipos 1 a 9, 11 a 27 e 29 a 34 e Enterovírus 68 a 71. Preferivelmente, o Enterovírus é poliovírus. Os antígenos para enterovírus

são preferivelmente selecionados de uma ou mais das proteínas de capsídeo VP1 que se seguem, VP2, VP3 e VP4. As vacinas contra pólio disponíveis comercialmente incluem vacina para pólio inativada (IPV) e vacina para poliovírus oral (OPV).

[0038] *Heparnavírus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Heparnavírus, tal como, vírus da Hepatite A (HAV). Vacinas contra HAV disponíveis comercialmente incluem vacina contra HAV inativada.

[0039] *Togavírus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Togavírus, tal como um Rubivírus, um Alfavírus ou um Arterivírus. Os antígenos derivados de Rubivírus, tais como vírus da rubéola são preferidos. Os antígenos do Togavírus podem ser selecionados de E1, E2, E3, C, NSP-1, NSPO-2, NSP-3 ou NSP-4. Os antígenos para Togavírus são selecionados preferivelmente de E1, E2 ou E3. Vacinas contra rubéola disponíveis comercialmente incluem um vírus adaptado ao frio vivo, tipicamente em combinação com vacinas contra sarampo e rubéola (MMR).

[0040] *Flavivírus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Flavivírus, tal como encefalite nata ao carrapato (TBE), Dengue (tipos 1, 2, 3 ou 4), febre amarela, encefalite japonesa, encefalite do West Nile, encefalite de St. Louis, encefalite de primavera-verão da Rússia, encefalite Powassan. Antígenos para flavivírus podem ser selecionados de PrM, M, C, E, NS-1, NS-2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5. Os antígenos para Flavivírus são selecionados preferivelmente de PrM, M e E. As vacinas contra TBE comercialmente disponíveis

incluem vacinas de vírus inativados.

[0041] *Pestivirus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Pestivirus, tal como, diarréia viral bovina (BVDV), febre suína clássica (CSFV) ou doença limítrofe (BDV).

[0042] *Hepadnavirus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um Hepadnavirus, tal como vírus da Hepatite B. Os antígenos para Hepadnavirus podem ser selecionados de antígenos de superfície e (L, M e S), antígenos de núcleo (HBc, HBe). Vacinas contra HBV disponíveis comercialmente incluem vacinas de subunidade compreendendo a proteína S do antígeno de superfície.

[0043] *Vírus da Hepatite C*: Os antígenos virais podem ser derivados de um vírus da Hepatite C (HCV). Os antígenos para HCV podem ser selecionados de um ou mais dentre E1, E2, E1/E2, poliproteína NS345, poliproteína de núcleo NS 345, núcleo, e/ou peptídeos das regiões não estruturais (Houghton e outros,, *Hepatology* (1991) 14:381).

[0044] *Rhabdovirus*: Antígenos virais podem ser derivados de um vírus da raiva, tal como um Lyssavirus (vírus da raiva) e Vesiculovirus (VSV). Os antígenos para o vírus da raiva podem ser selecionados da glicoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína grande (L), proteínas não estruturais (NS). A vacina contra o vírus da raiva disponível comercialmente compreende vírus mortos desenvolvidos nas células diplóides humanas ou células de pulmão de feto de macaco rhesus.

[0045] *Caliciviridae*: Os antígenos virais podem ser derivados de *Caliciviridae*, tais como, vírus Norwalk

e vírus semelhante ao Norwalk, tais como, vírus Hawaii e vírus Snow Mountain.

[0046] *Coronavírus:* Os antígenos virais podem ser derivados de um Coronavírus, SARS, coronavírus respiratório humano, bronquite infecciosa de aves (IBV), vírus da hepatite de camundongo (MHV) e vírus da gastroenterite transmissível dos porcos (TGEV). Os antígenos para o coronavírus podem ser selecionados do espigão (S), invólucro (E), matriz (M), nucleocapsídeo (N), e glicoproteína da hemaglutinina-esterase (HE). Preferivelmente, o antígeno para o coronavírus é derivado de um vírus SARS. Os antígenos virais para SARS são descritos no WO 04/92360.

[0047] *Retrovírus:* Os antígenos virais podem ser derivados de um retrovírus, tal como, oncovírus, um lentivírus ou um spumavírus. Os antígenos para oncovírus podem ser derivados de HTLV-1, HTLV-2 ou HTLV-5. Os antígenos para lentivírus podem ser derivados de HIV-1 ou HIV-2. Os antígenos para retrovírus podem ser selecionados de gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpu, e vpr. Os antígenos para HIV podem ser selecionados de gag (p24gag e p55gag), env (gp160 e gp41), pol, tat, nef, rev vpu, miniproteínas, (preferivelmente deleção de p55 gag e gp140v). Os antígenos para HIV podem ser derivados de uma ou mais das cepas que se seguem: HIVmb, HIVsF2, HIVLAV, HIVLAJ, HIVMN, HIV-1CM235, HIV-1Us4.

[0048] *Reovírus:* Os antígenos virais podem ser derivados de um reovírus, tal como um ortoreovírus, um rotavírus, um orbivírus ou um coltívírus. Os antígenos para reovírus podem ser selecionados de proteínas estruturais

$\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ ou $\sigma 3$ ou proteínas não estruturais, σNS , μNS ou σls . Os antígenos para reovírus preferidos podem ser selecionados de VP1, VP2, VP3, VP4 (ou o produto clivado de VP5 e VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4, ou NSP5. Os antígenos preferidos para rotavírus incluem VP4 (ou o produto clivado de VP5 e VP8) e VP7.

[0049] *Parvovírus*: Os antígenos virais podem ser derivados de um parvovírus, tal como, parvovírus B19. Os antígenos para parvovírus podem ser selecionados de VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 e NS-2. Preferivelmente, o antígeno do parvovírus é a proteína capsídeo VP-2.

[0050] *Vírus da hepatite Delta (HDV)*: Os antígenos virais podem ser derivados de HDV, especificamente δ -antígeno de HDV (vide, por exemplo, a Patente US número 5378814).

[0051] *Vírus da Hepatite E (HEV)*: Antígenos virais podem ser derivados de HEV. *Vírus da Hepatite G (HGV)*: Antígenos virais podem ser derivados de HGV.

[0052] *Herpesvírus humano*: Os antígenos virais podem ser derivados de um herpesvírus humano, tal como, vírus do herpes simples (HSV), vírus varicela-zoster (VZV), Epstein-Barr vírus (EBV), Citomegalovírus (CMV), Herpesvírus 6 humano (HHV6), Herpesvírus 7 humano (HHV7) e Herpesvírus 8 humano (HHV8). Os antígenos para os herpesvírus humanos podem ser selecionados de proteínas precoces imediatas (a), proteínas precoces (n) e proteínas tardias (y). Os antígenos para HSV podem ser derivados das cepas HSV-1 ou HSV-2. Os antígenos para HSV podem ser selecionados de glicoproteínas gB, gC, gD e gH, proteína de fusão (gB), ou proteínas de escape imune (gC, gE ou gI).

Antígenos para VZV podem ser selecionados de proteínas de núcleo, nucleocapsídeo, tegumento ou envólucro. Uma vacina contra VZV atenuado vivo se encontra comercialmente disponível. Os antígenos para EBV podem ser selecionados de proteínas de antígeno precoces (EA), antígeno capsídeo viral (VCA) e glicoproteínas do antígeno de membrana (MA). Os antígenos para CMV podem ser selecionados de proteínas de capsídeo, glicoproteínas de envólucro (tais como, gB e gH) e proteínas de tegumento.

[0053] *Papovavírus*: Os antígenos podem ser derivados de Papovavírus, tais como Papilomavírus e Poliomavírus. Os papilomavírus incluem sorotipos HPV 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 e 65. Preferivelmente, os antígenos para HPV são derivados dos sorotipos 6, 11, 16 ou 18. Os antígenos para HPV podem ser selecionados de proteínas de capsídeo (L1) e (L2), ou E1 - E7, ou fusões das mesmas. Os antígenos para HPV são preferivelmente formulados em partículas semelhantes a vírus (VLPs). Os vírus poliomavírus incluem vírus BK e vírus JK. Os antígenos para poliomavírus podem ser selecionados de VP1, VP2 ou VP3.

[0054] São providos adicionalmente os antígenos virais descritos em *Vacines*, 4ª Edição (Plotkin and Orenstein ed. 2004); *Medical Microbiology* 4ª Edição (Murray e outros, ed. 2002); *Virology*, 3ª Edição (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2nd Edição (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991), que são contempladas em conjunto com as composições da presente invenção.

[0055] As proteínas imunogênicas apropriadas para uso na invenção podem ser derivadas de um vírus que causa

doença respiratória. Exemplos de tais antígenos respiratórios incluem proteínas derivadas de um vírus respiratório, tal como, Orthomyxoviruses (*Influenza*), Pneumovírus (RSV), Paramyxovírus (PIV), Morbillivírus (sarampo), Togavírus (Rubéola), VZV, e Coronavírus (SARS). As proteínas imunogênicas derivadas do vírus *Influenza* são especificamente preferidas.

[0056] As composições da invenção podem incluir uma ou mais proteínas imunogênicas apropriadas para uso em indivíduos pediátricos. Os indivíduos pediátricos são tipicamente menos de cerca de 3 anos, ou menores de cerca de 2 anos ou de menos de 1 ano de idade. Os antígenos pediátricos podem ser administrados várias vezes no curso de 6 meses, 1, 2 ou 3 anos. Os antígenos pediátricos podem ser derivados de um vírus que pode ter como alvo populações pediátricas e/ou um vírus ao qual as populações pediátricas são suscetíveis a infecção. Os antígenos virais pediátricos incluem antígenos derivados de um ou mais de Orthomyxovírus (*Influenza*), Pneumovírus (RSV), Paramyxovírus (PIV e Caxumba), Morbillivírus (sarampo), Togavírus (Rubéola), Enterovírus (pólio), HBV, Coronavírus (SARS), e vírus varicela-zoster (VZV), Epstein Barr vírus (EBV).

[0057] As composições da invenção podem incluir uma ou mais proteínas imunogênicas apropriadas para uso em indivíduos mais velhos e imunocomprometidos. Tais indivíduos podem precisar ser vacinados mais frequentemente, com doses mais altas ou com formulações com adjuvante para melhorar a resposta imune aos antígenos alvejados. Os antígenos que podem ser alvejados para uso em Idosos ou indivíduos imunocomprometidos incluem antígenos

derivados de um ou mais dos vírus que se seguem: Orthomyxovírus (*Influenza*), Pneumovírus (RSV), Paramyxovírus (PIV e Caxumba), Morbillivírus (sarampo), Togavírus (Rubéola), Enterovírus (pólio), HBV, Coronavírus (SARS), vírus varicela-zoster (VZV), Epstein Barr vírus (EBV) e Citomegalovírus (CMV).

[0058] Após o crescimento dos vírus, o agente alquilante pode ser usado nos vírions purificados, por exemplo, nos vírions apresentados em uma cultura de célula clarificada, ou nos vírions purificados de tal cultura de célula purificada. Um método da invenção pode envolver remoção do material celular por clarificação e então purificação dos vírions da cultura de célula clarificada, por exemplo, por cromatografia. O agente alquilante pode ser usado nos vírions purificados dessa maneira, ou após uma etapa opcional adicional de ultrafiltração/diafiltração. Os métodos preferidos usam o agente alquilante não no sobrenadante clarificado de uma cultura de célula infectada, porém nos vírions purificados de tal sobrenadante clarificado (de acordo com Morgeaux e outros, (1993) *Vaccine* 11:82-90).

[0059] O agente alquilante é usado preferivelmente após uma etapa de remoção de endotoxina ter acontecido.

Etapas do Método

[0060] As composições de vacina da invenção podem ser preparadas por isolamento da proteína imunogênica e degradação do DNA residual funcional de célula hospedeira. De modo semelhante, as formulações de proteína recombinante podem ser preparadas por isolamento ou purificação da proteína recombinante e degradação do DNA residual

funcional de célula hospedeira. Essas etapas podem ser realizadas sequencial ou simultaneamente. A etapa de degradação do DNA residual de cultura de célula funcional é realizada por adição de um agente alquilante por exemplo, BPL.

[0061] O agente alquilante e quaisquer produtos colaterais são preferivelmente removidos antes da formulação final da vacina ou proteína recombinante. Preferivelmente, a composição de vacina ou formulação de proteína recombinante contém menos de 0,1% de ácido propiônico livre e PBL combinados (por exemplo, menos de 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, ou 0,01%. Preferivelmente, a composição de vacina final ou formulação de proteína recombinante contém menos de 0,01% de BPL.

[0062] BPL pode ser removido convenientemente por aquecimento, para causar hidrólise no ácido β -hidroxipropiônico não tóxico. O período de tempo necessário para hidrólise depende da quantidade total de BPL e da temperatura. Temperaturas mais altas fornecem hidrólise mais rápida, porém a temperatura não deve se elevar tão alto de modo a danificar os ingredientes proteínicos ativos. Conforme descrito a seguir, o aquecimento a cerca de 37°C por 2-2 horas e meia é apropriado para remoção da BPL.

[0063] Após tratamento do DNA, os produtos residuais do DNA podem ser retidos na composição imunogênica ou recombinante final. Mais preferivelmente, contudo, eles foram separados dos componentes desejados, por exemplo, separados dos vírions/proteínas. A separação dessa forma pode remover os produtos de degradação do DNA

em parte ou completamente e preferivelmente, remove qualquer DNA degradado que seja superior a 200 pares de base. Assim, um método da invenção pode incluir uma etapa de separação do DNA dos vírions. Essa etapa de separação pode envolver, por exemplo, um ou mais dentre ultrafiltração, ultra centrifugação (incluindo ultra centrifugação gradiente), transformação em microesferas do núcleo do vírus e fracionamento do sobrenadante, cromatografia (tal como, cromatografia de troca de íon, por exemplo, troca de ânion), adsorção, etc.

[0064] Sobretudo, portanto, um processo pode envolver tratamento com um agente alquilante para degradar o comprimento do DNA residual e mais tarde purificação para remover DNA residual (incluindo remoção do DNA degradado).

Cultura de Célula

[0065] As vacinas da invenção são preparadas por vírus que são propagados na cultura da célula. Além disso, a invenção inclui formulações de proteínas recombinantes expressas na cultura de célula. As culturas de célula de mamífero são preferidas para ambas a replicação viral e expressão da proteína recombinante.

[0066] Várias linhagens de célula de mamífero são conhecidas na arte e incluem linhagens de células derivadas de células de primata humano ou não humano (por exemplo, macaco) (por exemplo, células PER.C6 que são descritas, por exemplo, no W001/38362, W001/41814, W002/40665, W02004/056979, e W02005/080556, incorporados aqui como referência em sua totalidade, bem como depositados sob o número de depósito ECACC 96022940), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células HEIR, células HeLa, células de

pulmão fetal de rhesus (ATCC CL-160), células de rim embrionárias (293 células, tipicamente transformadas por DNA de adenovírus compartilhado tipo 5), células Vero (de rins de macacos), cavalo, vaca (por exemplo, células MDBK), carneiro, cachorro (por exemplo, células MDCK de rins de cachorro, (por exemplo, células MDCK de rins de cachorro, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) ou MDCK 33016, número do depósito DSM ACC 2219 conforme descrito no WO 97/37000 e WO 97/37001), gatos e roedores (por exemplo, células de hamster, tal como BHK21-F, células HKCC, ou células de ovário de hamster chinês (CHO)) e podem ser obtidas de uma grande variedade de estágios de desenvolvimento, incluindo, por exemplo, adulto, neonatal, fetal e embrião.

[0067] As células de macaco apropriadas são, por exemplo, células de macaco verde Africano, tais como células de rim como na linhagem de célula Vero. Células de cachorro apropriadas são, por exemplo, células de rim como na linhagem de célula MDCK. Assim, as linhagens de célula apropriadas incluem, porém não estão limitadas a: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. O emprego de células de mamífero significa que as vacinas podem ser isentas de materiais, tais como, DNA de galinha, proteínas de ovo (tal como, ovalbumina e ovomucóide), etc., pelo que, reduzindo a alergenicidade.

[0068] Em determinadas concretizações as células são imortalizadas (por exemplo, células PER.C6; ECACC 96022940). Nas concretizações preferidas, as células de mamífero são utilizadas, e podem ser selecionadas e/ou derivadas de um ou mais tipos de célula não limitantes

que se seguem: células de fibroblasto (por exemplo, dérmica, pulmão), células endoteliais (por exemplo, aórtica, coronária, pulmonar, vascular, microvascular dérmica, umbilical), hepatócitos, ceratinócitos, células imune (por exemplo, célula T, célula B, macrófago, NK, dendrítica), células de mamíferos (por exemplo, epiteliais), células de músculo liso (por exemplo, vascular, aórtica, coronária, arterial, uterina, brônquica, cervical, pericitos retinianos), melanócitos, células neurais (por exemplo, astrocitos), células da próstata (por exemplo, epitelial, músculo liso), células renais ou dos rins (por exemplo, epitelial, mensangial, túbulo proximal), células esqueléticas (por exemplo, condrócito, osteoclasto, osteoblasto), células musculares (por exemplo, mioblasto, esquelética, lisa, brônquica), células do fígado, células retinianas ou retinoblastos, células do pulmão e células estromais.

[0069] O W097/37000 e o W097/37001 descrevem a produção de células de animais e linhagens de células que são capazes de se desenvolver na suspensão e no meio isento de soro e são úteis na produção e replicação dos vírus, especificamente vírus *Influenza*. Detalhes adicionais são fornecidos no W003/023021 e no W003/023025.

[0070] As linhagens de células de mamíferos preferidas para desenvolvimento dos vírus *Influenza* incluem: células de MDCK, derivadas dos rins de cães Madin Darby; células Vero, derivadas dos rins de macaco verde Africano (*Cercopithecus aethiops*); ou células PER.C6, derivadas de retinoblastos embriônicos humanos.

Essas linhagens de células são amplamente disponíveis, por exemplo, da American Type Cell Culture (ATCC) collection, de Coriell Cell Repositories ou da European Collection of Cell Cultures (ECACC). Por exemplo, o ATCC fornece várias células Vero deferentes sob números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 e CRL-1587, e fornece células MDCK sob número de catálogo CCL-34. PER.C6 está disponível a partir do ECACC sob número de depósito 96022940.

[0071] As linhagens de células mais preferidas para desenvolvimento dos vírus *Influenza* são linhagens de célula MDCK. A linhagem de célula MDCK original está disponível na ATCC como CCL-34, porém derivados dessa linhagem de célula podem também ser empregados. Por exemplo, W097/37000 revela uma linhagem de célula MDCK que foi adaptada para crescimento na cultura de suspensão ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). De modo semelhante, EP-A-1260581 (WO01/64846) revela uma linhagem de célula derivada de MDCK que se desenvolve na suspensão em cultura isenta de soro ('B-702', depositada como FERM BP-7449). W02006/071563 revela células de MDCK não tumorigênicas, incluindo 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) e 'MOCK-SF103' (PTA-6503). W02005/113758 revela linhagens de célula MDCK com alta suscetibilidade à infecção, incluindo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Qualquer uma dessas linhagens de célula MDCK pode ser empregada.

[0072] A manipulação das culturas de células MDCK na suspensão e culturas aderentes é descrita no W097/37000, W097/37001, W003/023021 e W003/023025.

Especificamente, o WO 03/023021 e o WO 03/023025 descrevem volumes de cultura de célula em escala laboratorial e comercial das células de suspensão MDCK em meios isentos de soro, meios definidos quimicamente, e meios isentos de proteína. Cada referência é incorporada aqui em sua totalidade.

[0073] Como uma alternativa às fontes de mamíferos, as linhagens de célula para uso na invenção podem ser derivadas de fontes de aves, tais como, galinhas, patos, gansos ou faisões. As linhagens de células de aves podem ser derivadas de uma variedade de estágios de desenvolvimento incluindo embriônico, pintinho e adulto. Preferivelmente, as linhagens de célula são derivadas de células embriônicas, tais como, fibroblastos embriônicos, células germinais ou órgãos individuais, incluindo neuronais, cérebro, retina, rins, fígado, coração, músculo ou tecidos extraembriônicos e membranas de proteção do embrião. Exemplos de linhagens de células de aves incluem células tronco embriônicas de aves (WO01/85938 e WO03/076601) e células de retina de pato (WO2005/042728). Células tronco embrionárias de aves incluem a linhagem de célula EBx derivada das células tronco embrionárias de galinha, EB45, EB14 e EB14-074 (WO2006/108846). Os fibroblastos de embriões de galinha (CEF) podem também ser usados. Essas células de aves são especificamente apropriadas para o desenvolvimento do vírus *Influenza*.

[0074] Sistemas de expressão de células de inseto, tais como, sistemas de expressão recombinantes de baculovírus, são conhecidos dos versados na técnica e

descritos, por exemplo, em Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* No. 1555 (1987). Os materiais e métodos para os sistemas de expressão da célula de inseto/baculovírus são comercialmente disponíveis na forma de kit, entre outros, na Invitrogen, San Diego CA. As células de inseto para uso com os vetores de expressão do baculovírus incluem, entre outros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni*.

[0075] A expressão recombinante das proteínas pode também ser conduzida em hospedeiros bacterianos, tais como, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus spp.*. Os hospedeiros levedura apropriados para expressão recombinante das proteínas incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Yarrowia lipolytica*.

[0076] As condições da cultura para os tipos de célula acima são bem descritas em uma variedade de publicações ou alternativamente meios de cultura, suplementos e condições podem ser adquiridos comercialmente, tal como, por exemplo, descrito no catálogo e literatura adicional da Cambrex Bioproducts (East Rutherford, NJ).

[0077] Em determinadas concretizações, as células hospedeiras usadas nos métodos descritos aqui são cultivadas em meio isento de soro e/ou de proteína. Um meio

é referido como um meio isento de soro no contexto da presente invenção, onde não existem aditivos do soro de origem animal ou humana. Isento de proteína significa culturas onde a multiplicação das células ocorre com exclusão das proteínas, fatores de crescimento, outros aditivos de proteínas e proteínas que não soro, porém podem incluir, opcionalmente proteínas, tais como, tripsina ou outras proteases que podem ser necessárias para o crescimento viral. As células que crescem em tais culturas contém naturalmente proteína propriamente.

[0078] Os meios isentos de soro conhecidos incluem meio de Iscove, meio Ultra-CHO (BioWhittaker) ou EX-CELL (JRH Bioscience). Os meios contendo soro comuns incluem Meio Basal da Eagles (BME) ou Meio Essencial Mínimo (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) ou Meio Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM ou EDM), que são geralmente usados com até 10% de soro fetal de bezerro ou aditivos semelhantes. Opcionalmente, o Meio Essencial Mínimo (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) ou Meio Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM ou EDM) pode ser usado sem qualquer suplemento contendo soro. Os meios isentos de proteína como PF-CHO (JHR Bioscience), meios definidos quimicamente ProCHO 4CDM (BioWhittaker) ou SMIF 7 (GibcoBRL Life Technologies) e peptídeos mitogênicos como Primactone, Pepticase ou HyPep™ (todos da Quest International) ou hidrolisado de lactalbumina (Gibco e outros fabricantes) são também adequadamente conhecidos na técnica anterior. Esses aditivos de meio com base nos hidrolisados de planta possuem a vantagem especial de que a contaminação com vírus, micoplasma ou agentes de infecção desconhecidos pode

ser evitada.

[0079] As condições de cultura da célula (temperatura, densidade celular, valor do pH, etc.) são variáveis em uma ampla faixa devido à adequabilidade da linhagem de célula empregada de acordo com a invenção e podem ser adaptadas aos requisitos das condições de crescimento do vírus ou detalhes de expressão recombinante.

[0080] As células podem se desenvolver de vários modos, por exemplo, em suspensão, em cultura aderente ou microveículos.

[0081] As células podem se desenvolver abaixo de 37°C (por exemplo, 30-36°C) durante a replicação viral (WO97/37001).

[0082] O método para propagação do vírus em células cultivadas geralmente inclui as etapas de inoculação das células cultivadas com a cepa a ser cultivada, cultivo das células infectadas por um período de tempo desejado para a propagação do vírus, tal como, por exemplo, conforme determinado por titulação do vírus ou expressão do antígeno (por exemplo, entre 24 e 168 horas após a inoculação) e coleta do vírus propagado. As células cultivadas 1:100 a 1:5, mais preferivelmente 1:50 a 1:10. O vírus podem ser adicionados a uma suspensão das células ou aplicado a uma monocamada de células e o vírus é absorvido nas células por pelo menos 60 minutos, porém geralmente menos de 300 minutos, preferivelmente entre 90 e 240 minutos a 25°C a 40°C, preferivelmente 28°C a 37°C.

[0083] A cultura de célula infectada (por exemplo, monocamadas) pode ser removida tanto por congelamento-descongelamento ou ação enzimática para aumentar o teor

viral dos sobrenadantes de cultura colhidos. Os fluidos colhidos são então tanto inativados quanto armazenados congelados. As células de cultura podem ser infectadas em uma variedade de infecções ("m.o.i") de cerca de 0,001 a 10, preferivelmente 0,002 a 5, mais preferivelmente a 0,001 a 2. Ainda mais preferivelmente, as células são infectadas em uma m.o.i de cerca de 0,01. As células infectadas podem ser colhidas 30 a 60 horas após infecção. Preferivelmente, as células são colhidas 34 a 48 horas após a infecção. Ainda mais preferivelmente, as células são colhidas 38 a 40 horas após a infecção. As proteases (tipicamente tripsina) são geralmente adicionadas durante a cultura da célula para permitir liberação viral e as proteases podem também ser adicionadas a qualquer estágio apropriado durante a cultura.

[0084] As composições de vacina da invenção geralmente serão formuladas em uma forma de sub-vírião, por exemplo, na forma de um vírus dividido, onde o invólucro de lipídeo viral foi dissolvido ou rompido ou na forma de uma ou mais proteínas virais purificadas. A composição de vacina conterá uma quantidade suficiente do(s) antígeno(s) para produzir uma resposta imunológica no paciente.

[0085] Os métodos de divisão de vírus, tal como, vírus *Influenza*, são bem conhecidos na arte, por exemplo, vide WO02/28422, WO02/067983, WO02/074336, WO01/21151, etc. A divisão do vírus é realizada por interrupção ou fragmentação do vírus integral, se infeccioso (tipo selvagem ou atenuado) ou não infeccioso (por exemplo, inativado) com uma interrupção da concentração de um agente de divisão. Os agentes de divisão geralmente incluem

agentes capazes de romper e dissolver as membranas lipídicas, tipicamente com uma cauda hidrófoba anexada a uma cabeça hidrófila. O agente de divisão mais preferido é ao brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Detalhes adicionais da divisão são fornecidos a seguir no contexto dos vírus Influenza.

[0086] A interrupção resulta em uma solubilização plena ou parcial das proteínas virais, alterando a integridade do vírus. Agentes de divisão preferidos são agentes tensoativos não iônicos e iônicos (por exemplo, catiônicos), por exemplo, alquilglicosídeos, alquiltioglicosídeos, açúcares acila, sulfobetainas, betainas, polioxietilenoalquiléteres, N,N-dialquilglicamidas, Hecameg, alquilfenóxi-polietoxietanóis, compostos amônio quaternários, sarcosila, CTABs (brometos de cetil trimetil amônio), fosfato de tri-N-butila, Cetavlon, sais de miristiltrimetilamônio, lipofectina, lipofectamina e DOT-MA, ou octil ou nonilfenóxi polioxietanóis (por exemplo, os agentes tensoativos Triton, tais como, Triton X-100 ou Triton N101), ésteres de polioxietileno sorbitano (os agentes tensoativos Tween), éteres polioxietileno, ésteres polioxietileno, etc.

[0087] Os métodos de purificação das proteínas individuais dos vírus são bem conhecidos e incluem, por exemplo, etapas de filtração, cromatografia, e eluição da fibra oca. Em uma concretização, as proteínas são purificadas por resina trocadora de íon.

[0088] Como uma alternativa adicional, a vacina pode incluir um vírus integral, por exemplo, um vírus vivo integral atenuado ou preferivelmente, um vírus integral

inativado. Os métodos para inativação ou morte dos vírus para destruir sua capacidade de infectar as células de mamíferos são bem conhecidos na arte. Tais métodos incluem ambos meios químicos e físicos. Os meios químicos para inativação de um vírus incluem tratamento com uma quantidade eficaz de um ou mais dos seguintes agentes: detergentes, aldeído fórmico, formalina, BPL ou luz UV. Os meios químicos adicionais para inativação incluem tratamento com azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60) ou uma combinação de cada um. Outros métodos de inativação viral são conhecidos na arte, tais como, por exemplo, etilamina binária, acetil etilenoimina ou irradiação gama. Preferivelmente, o vírus é inativado com BPL.

Composições Farmacêuticas

[0089] As composições da invenção são farmaceuticamente aceitáveis. Elas geralmente incluem componentes diferentes dos antígenos, por exemplo, elas incluem tipicamente um ou mais veículo(s) farmacêutico(s) e/ou excipiente(s). Uma discussão completa de tais componentes está disponível em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro, 2000; 20^a edição, ISBN: 0683306472).

[0090] As composições de modo geral estarão na forma aquosa.

[0091] A composição pode incluir um ou mais preservativos, tais como, tiomersal ou 2-fenoxietanol. Contudo, é preferido que a vacina seja substancialmente isenta (isto é, menos de 5 µg/mL) de material de mercúrio, por exemplo, isenta de tiomersal (Banzhoff (2000)

Immunology Letters 71:91-96; W002/097072). As vacinas não contendo mercúrio são mais preferidas. As vacinas isentas de preservativo são especificamente preferidas.

[0092] É preferido incluir um sal fisiológico, tal como, um sal de sódio, por exemplo, para controlar a tonicidade. O cloreto de sódio (NaCl) é preferido, podendo estar presente entre 1 e 20 mg/mL. Outros sais que podem estar presentes incluem cloreto de potássio, fosfato de diidrogênio potássio, deidrato fosfato de dissódio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, etc.

[0093] As composições geralmente terão uma osmolalidade entre 200 mOsm/kg e 400 mOsm/kg, preferivelmente entre 240-360 mOsm/kg e mais preferivelmente se encontram dentro da faixa de 290-310 mOsm/kg.

[0094] As composições podem incluir um ou mais tampões. Os tampões típicos incluem: um tampão de fosfato; um tampão Tris; um tampão de borato; um tampão de succinato; um tampão de histidina (especificamente com um adjuvante de hidróxido de alumínio); ou um tampão de citrato. Os tampões tipicamente estarão incluídos na faixa de 5-20 mM.

[0095] O pH de uma composição estará, preferivelmente, entre 5,0 e 8,1 e, mais tipicamente entre 6,0 e 8,0, por exemplo, 6,5 e 7,5. Um método da invenção portanto, pode incluir uma etapa de ajuste do pH da vacina em volume antes do embalamento.

[0096] A composição é preferivelmente estéril. A composição é preferivelmente não pirogênica, por exemplo, contendo < 1 EU (unidade de endotoxina, uma medida padrão)

por dose e, preferivelmente, < 0,1 EU por dose. A composição é preferivelmente isenta de glúten.

[0097] As composições da invenção podem incluir detergentes, por exemplo, um agente tensoativo éster sorbitano polioxietileno (conhecido como "Tweens"), um octoxinol (tal como, octoxinol-9 (Triton X-100) ou t-octilfenoxipolietoxietanol), um brometo de amônio cetil trimetila ("CTAB") ou desoxicolato de sódio. O detergente pode estar presente apenas em quantidades de traço.

[0098] A composição pode incluir material para uma imunização simples ou pode incluir material para imunizações múltiplas (isto é, um kit de "múltiplas doses"). A inclusão de um preservante é útil nas disposições de múltiplas doses. Como uma alternativa (ou adição) para inclusão de um preservante em composições de múltiplas doses, as composições podem ser contidas em um recipiente possuindo um adaptador asséptico para remoção do material.

[0099] As vacinas são tipicamente administradas em um volume de dosagem de cerca de 0,5 mL, embora uma meia dose (por exemplo, cerca de 0,25 mL) possa ser administrada à criança.

[00100] As composições e kits são preferivelmente armazenados entre 2°C e 8°C. Elas não seriam congeladas. Elas deveriam ser mantidas, de modo ideal, fora da luz direta.

Métodos de tratamento e administração de vacinas

[00101] As composições da invenção são apropriadas para administração aos pacientes animais (e, especialmente o homem) e a invenção provê um método para acionar a

resposta imune em um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição da invenção ao paciente.

[00102] A invenção também provê um kit ou composição da invenção para uso como um medicamento.

[00103] A invenção também provê o emprego de proteínas imunogênicas derivadas de um vírus propagado na cultura de célula, onde a dita vacina é substancialmente isenta de DNA residual de cultura de célula funcional, na fabricação de um medicamento para acionar a resposta imune em um paciente.

[00104] A resposta imune acionada por esses métodos e usos incluirá, de modo geral, uma resposta de anticorpo, preferivelmente uma resposta do anticorpo de proteção. Os métodos para avaliar as respostas do anticorpo, capacidade de neutralização e proteção após vacinação viral são bem conhecidos na arte. Para vírus *Influenza*, por exemplo, os estudos humanos mostram que as titulações de anticorpo contra HA estão relacionadas à proteção (uma titulação de inibição de hemaglutinação da amostra de soro de cerca de 30-40 fornece cerca de 50% de proteção contra infecção por um vírus homólogo) [Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75].

[00105] As composições da invenção podem ser administradas de vários modos. A via de imunização mais preferida é por injeção intramuscular (por exemplo, no braço ou perna), porém outras vias disponíveis incluem injeção subcutânea, intranasal, oral, intradérmica, transcutânea, transdérmica, etc.

[00106] As vacinas preparadas de acordo com a invenção podem ser usadas para tratar crianças e adultos. O

paciente pode ter menos de 1 ano de idade, 1-5 anos de idade, 5-15 anos de idade, 15-55 anos de idade, ou pelo menos 55 anos de idade. Os pacientes podem ser mais velhos (por exemplo, > 50 anos de idade, > 60 anos de idade e preferivelmente > 65 de idade), e jovens (por exemplo, < 5 anos de idade), pacientes hospitalizados, trabalhadores da saúde, pessoal das forças armadas, mulheres grávidas e os pacientes cronicamente doentes, imunodeficientes, que tomaram um composto antiviral (por exemplo, um composto oseltamivir ou zanamivir para *Influenza*; vide a seguir) nos 7 dias antes de receber a vacina, pessoas com alergias a ovos e pessoas que viajam ao exterior. As vacinas não são unicamente apropriadas a esses grupos, contudo e podem ser usadas de modo geral na população.

[00107] O tratamento pode ser feito por uma programação de dose simples ou uma programação de múltiplas doses. As múltiplas doses podem ser usadas em uma programação de imunização primária e/ou em uma programação de imunização de reforço. Em uma programação de dose múltipla, as várias doses podem ser fornecidas pelas mesmas ou por vias diferentes, por exemplo, por um reforço parenteral e mucosal, um reforço mucosal e parenteral, etc.. A administração de mais de uma dose (tipicamente duas doses) é especificamente útil nos pacientes não desafiados imunologicamente. Doses múltiplas tipicamente serão administradas pelo menos 1 semana separada (por exemplo, cerca de duas semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 6 semanas, cerca de 8 semanas, cerca de 10 semanas, cerca de 12 semanas, cerca de 16 semanas, etc.).

[00108] As vacinas produzidas pela invenção podem ser administradas aos pacientes substancialmente ao mesmo tempo (por exemplo, durante a mesma consulta médica ou visita a um profissional de saúde ou centro de vacinação) que outras vacinas, por exemplo, substancialmente ao mesmo tempo em que uma vacina bacteriana, tal como uma vacina para difteria, uma vacina para tétano, uma vacina para coqueluche, uma vacina para DTP, uma vacina conjugada para *H.Influenzae* do tipo b, uma vacina de conjugado meningocócico (tal como uma vacina tetravalente A-C-W135-Y), uma vacina de conjugado pneumocócico, etc.

[00109] De modo semelhante, as vacinas da invenção podem ser administradas aos pacientes substancialmente ao mesmo tempo (por exemplo, durante a mesma consulta ou visita a um profissional de saúde) como um composto antiviral eficaz contra o vírus da vacina. Quando a vacina for uma vacina contra *Influenza*, por exemplo, o(s) composto(s) pode(m) ser um inibidor de neuraminidase (por exemplo, oseltamivir e/ou zanamivir). Esses antivirais incluem um ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropóxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico ou um ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anidro-3,4,5-trideóxi-D-glicero-D-galactonon-2-enônico, incluindo ésteres dos mesmos (por exemplo, os ésteres etílicos) e sais dos mesmos (por exemplo, os sais de fosfato). Um antiviral eficaz contra *Influenza* é o ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropóxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster etílico, fosfato (1:1), também

conhecido como fosfato oseltamivir (TAMIFLUTM).

DNA da Célula Hospedeira

[00110] A medição do DNA da célula hospedeira está dentro das capacidades normais do versado na técnica. A quantidade total do DNA residual nas composições da invenção é preferivelmente inferior a 20 ng/mL por exemplo, < 10 ng/mL, < 5 ng/mL, < 1 ng/mL, < 100 pg/mL, < 10 pg/mL, etc. Conforme descrito acima, substancialmente todo esse DNA é preferivelmente inferior a 500 pares de base de comprimento.

[00111] O ensaio usado para medir o DNA tipicamente será um ensaio validado (*Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Maio de 2001; Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197). As características de desempenho do ensaio validado podem ser descritas em termos matemáticos e quantificáveis e suas fontes possíveis de erro serão identificadas. O ensaio geralmente será testado quanto as características tais como, exatidão, precisão, especificidade. Uma vez que o ensaio tenha sido calibrado (por exemplo, contra quantidades padrão conhecidas de DNA de célula de hospedeiro) e testado, então medições de DNA quantitativas podem ser realizadas rotineiramente. Três técnicas principais para quantificação de DNA podem ser usadas: métodos de hibridização, tais como, Southern blots ou slot blots (Ji e outros, (2002) *Biotechniques*.

32:1162-7); métodos de imunoensaio, tais como o ThresholdTM System (Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol.* 45:7-12; e PCR quantitativa (Lahijani e outros, (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80). Esses métodos são todos familiares a um versado na técnica, embora as características precisas de cada método possam depender da célula de hospedeiro em questão, por exemplo, a escolha das sondas para hibridização, a escolha dos iniciadores e/ou sondas para ampliação, etc. O sistema ThresholdTM da *Molecular Devices* é um ensaio quantitativo para níveis de picograma do DNA total e foi usado para monitorar os níveis de contaminação do DNA nos biofarmacêuticos (Briggs (1991) *supra*). Um ensaio típico envolve formação não específica de sequência de um complexo de reação entre uma proteína de ligação de DNAss biotinilada, um anticorpo anti-DNAss conjugado com urease e DNA. Todos os componentes do ensaio estão incluídos no Kit de Ensaio de DNA total e completo disponível no fabricante. Vários fabricantes comerciais oferecem ensaios de PCR quantitativos, para detecção do DNA residual da célula hospedeira, por exemplo, AppTecTM Laboratory Services, BioRelianceTM, Althea Technologies, etc. Uma comparação de um ensaio de hibridização quimioluminescente e do sistema ThresholdTM de DNA total para medição da contaminação do DNA da célula hospedeira de uma vacina viral humana pode ser encontrada em Lokteff e outros, (2001) *Biologicals.* 29:123-32.

[00112] Esses vários métodos analíticos também podem ser usados para medir o comprimento de um DNA residual de célula hospedeira. Conforme mencionado acima, o comprimento

médio de um DNA residual de célula, após tratamento com o agente alquilante, é preferivelmente inferior a 500 pares de base ou mesmo inferior a 200 pares de base.

[00113] Em relação às células caninas, especificamente, tais como as células MDCK, a análise do genoma revela 13 sequências de codificação com < 500 pares de base de comprimento, 3 sequências < 200 pares de base e 1 sequência < 100 pares de base. Assim, a fragmentação do DNA para < 200 pares de base remove substancialmente todas as sequências de codificação e é altamente improvável que qualquer fragmento correspondesse realmente a um dos 3 genes ao redor daquele comprimento (a saber: secretina em 81 pares de base; PYY em 108 pares de base e osteocalcina em 135 pares de base).

Adjuvantes

[00114] As composições da invenção podem incluir um adjuvante, que pode funcionar para melhorar as respostas imunes (humoral e/ou celular) promovidas em um paciente que recebe a composição. O uso de adjuvantes com vacinas virais é bem conhecido, por exemplo, nas vacinas contra hepatite, vacinas contra pólio, etc. A vacina contra *Influenza* FLUAD™ inclui um adjuvante de emulsão de óleo em água.

[00115] Os adjuvantes que podem ser empregados com a invenção incluem, porém não estão limitados aos sais de alumínio, oligonucleotídeos imunoinflamatórios, saponinas, análogos de lipídeo A (tais como, 3dMPL) e emulsões de óleo em água. Esses e outros adjuvantes são revelados em maiores detalhes em Powell & Newman (*Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Plenum Press 1995, ISBN 0-306-44867-X) e O'Hagan (*Vaccine Adjuvants: Preparation*

Methods and Research Protocols, volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series, ISBN: 1-59259-083-7).

[00116] Os adjuvantes conhecidos como hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio podem ser empregados. Esses nomes são convencionais, porém são usados apenas por conveniência, como nenhum é uma descrição precisa do composto químico real que está presente (por exemplo, vide capítulo 9 de Powell & Newman). A invenção pode utilizar qualquer um dentre adjuvantes de "hidróxido" ou "fosfato" que são em geral usados como adjuvantes. A absorção nesses sais é preferida.

[00117] Os oligonucleotídeos imunoestimuladores com atividade adjuvante são bem conhecidos. Eles podem conter um motivo CpG (uma sequência de dinucleotídeo contendo uma citosina não metilada ligada por uma ligação fosfato a uma guanossina), um motivo TpG, uma sequência oligo-dT, uma sequência oligo-dC, RNA de filamento duplo, sequências palindrômicas, uma sequência poli(dG), etc. Oligonucleotídeos imunoestimuladores tipicamente compreenderão pelo menos 20 nucleotídeos e podem compreender pouco mais de 100 nucleotídeos.

[00118] As saponinas (capítulo 22 de Powell & Newman) são um grupo heterólogo de glicosídeos de esterol e glicosídeos de triterpenóide que são encontrados nas cascas, folhas, caules, raízes e mesmo flores de uma ampla faixa de espécies de plantas. As saponinas da casca da árvore Molina *Quillaia saponaria* foram amplamente estudadas como adjuvantes. As formulações de adjuvante da saponina incluem formulações purificadas, tais como, QS21, bem como formulações de lipídeo, tais como ISCOMs. As

composições de saponina foram purificadas usando HPLC e RP-HPLC e frações purificadas específicas usando essas técnicas foram identificadas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. Preferivelmente, a saponina é QS21. Um método para produção ode QS21 é revelado na Patente US número 5057540. As formulações de saponina podem também compreender um esterol, tal como, colesterol (WO96/33739). As combinações das saponinas e colesteróis podem ser usadas para formar partículas únicas denominadas complexos imunoestimulantes (ISCOMs), ISCOMs, que tipicamente também incluem um fosfolípideo.

[00119] 3dMPL (também conhecido com lipídeo monofosforila A 3 des-O-acilado ou lipídeo 3-O-desacil-4'-monofosforila) é um adjuvante onde a posição 3 de redução da glicosamina de extremidade no lipídeo monofosforila A foi desacilada. 3dMPL foi preparado de um mutante de isento de heptose de *Salmonella minnesota*, e é quimicamente semelhante ao lipídeo A, porém não possui um grupo fosforila instável em ácido e um grupo acila instável em base. 3dMPL pode tomar a forma de uma mistura de moléculas correlatas, variando em sua acilação (por exemplo, possuindo 3, 4, 5 ou 6 cadeias de acila, que podem ser de comprimentos diferentes).

[00120] Várias emulsões de óleo em água com atividade adjuvante são conhecidas. Elas incluem, tipicamente, pelo menos um óleo e pelo menos um agente tensoativo, com o(s) óleo(s) e agente(s) tensoativo(s) sendo biodegradáveis (metabolizáveis) e biocompatíveis. As gotículas de óleo na emulsão geralmente possuem diâmetros de submícron, com esses tamanhos pequenos

sendo obtidos com um microfluidificador para prover emulsões estáveis. As gotículas com um tamanho inferior a 220 nm são preferidas e podem ser submetidas à esterilização em filtro.

[00121] Adjuvantes de emulsão de óleo em água específicos úteis com a invenção incluem, porém não estão limitados a:

- uma emulsão de submicron de esqualeno, Tween 80 e Span 85. A composição da emulsão em volume pode ser de cerca de 5% de esqualeno, 0,5% de polissorbato 80 e cerca de 0,5% de Span 85. Em termos de peso, essas razões se tornam 4,3% de esqualeno, 0,5% de polissorbato 80 e 0,48% de Span 85. Esse adjuvante é conhecido como "MF59", conforme descrito em maiores detalhes no Capítulo 10 do Powell & Newman e capítulo 12 de O'Hagan. A emulsão MF59 inclui, vantajosamente, íons citrato, por exemplo, 10 mM de tampão de citrato de sódio.

- uma emulsão de esqualeno, tocoferol e Tween 80. A emulsão pode incluir salmoura tamponada com fosfato. Ela também pode incluir Span 85 (por exemplo a 1%) e/ou lecitina. Essas emulsões podem ter de 2 a 10% de esqualeno, de 2 a 10% de tocoferol e de 0,3 a 3% de Tween 80 e a razão em peso de esqualeno:tocoferol é preferivelmente $\leq$ a 1 como isso provê uma emulsão mais estável. O esqualeno e o Tween 80 podem estar presentes em razão de volume de cerca de 5:2. Uma tal emulsão pode ser fabricada por dissolução do Tween 80 em PBS para fornecer uma solução a 2%, então a mistura de 90 mL dessa solução com uma mistura de (5 g de DL- α -tocoferol e 5 mL de esqualeno), então microfluidificação da mistura. A emulsão resultante pode

possuir gotículas de óleo de submicron, por exemplo, com um diâmetro médio entre 100 e 250 nm, preferivelmente cerca de 180 nm.

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

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

Vacinas contra Influenza

[00122] A invenção é especificamente apropriada para preparação de vacinas contra o vírus *Influenza*. Várias formas de vacinas contra vírus *Influenza* estão disponíveis atualmente, por exemplo, vide capítulos 17 e 18 de Plotkin & Orenstein (*Vaccines*, 4ª edição, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0). De modo geral, elas se baseiam no vírus vivo ou vírus inativado. As vacinas inativadas têm como base os vírions integrais, vírions "divididos" ou antígenos de superfície purificados (incluindo hemaglutinina). Os antígenos para *Influenza* podem também ser preparados na forma de virossomas (partículas lipossômicas semelhantes a vírus

isentas de ácido nucléico). Os antígenos purificados de um hospedeiro recombinante (por exemplo, em uma linhagem celular de isento usando um vetor de baculovírus) também podem se usados.

[00123] Os meios químicos para inativar um vírus incluem tratamento com uma quantidade eficaz de um ou mais dos seguintes agentes: detergentes, aldeído fórmico, β -propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60), etilamina binária, acetil etilenoimina ou combinações dos mesmos. Métodos não químicos de inativação viral são conhecidos na arte, tais como, por exemplo, luz UV ou irradiação gama.

[00124] Os vírions podem ser colhidos de fluidos contendo vírus por vários métodos. Por exemplo, um processo de purificação pode envolver centrifugação por zona usando uma solução gradiente linear de sacarose que inclui detergente para interromper os vírions. Os antígenos podem então ser purificados, após diluição opcional por diafiltração.

[00125] Os vírions divididos são obtidos por tratamento dos vírions purificados com detergentes (por exemplo, éter etílico, polissorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-*N*-butila, Triton X-100, Triton N101, brometo de cetiltrimetilamônio, etc.) para produzir preparações de sub-vírião, incluindo os processo de divisão "Tween-éter"). Os métodos de divisão dos vírus *Influenza*, são bem conhecidos na arte, por exemplo, vide WO02/28422, WO02/067983, WO02/074336, WO01/21151, WO02/097072, WO2005/113756, etc. A divisão do vírus é realizada por interrupção ou fragmentação do vírus integral, se

infeccioso ou não infeccioso com uma interrupção da concentração de um agente de divisão. A interrupção resulta em uma solubilização plena ou parcial das proteínas virais, alterando a integridade do vírus. Agentes de divisão preferidos são agentes tensoativos não iônicos e iônicos (por exemplo, catiônicos), por exemplo, alquilglicosídeos, alquiltioglicosídeos, açúcares acila, sulfobetainas, betainas, polioxietilenoalquiléteres, N,N-dialquilglicamidas, Hecameg, alquilfenóxi-polietoxietanóis, compostos amônio quaternários, sarcosila, CTABs (brometos de cetil trimetil amônio), fosfato de tri-N-butila, Cetavlon, sais de miristiltrimetilamônio, lipofectina, lipofectamina e DOT-MA, os octil ou nonilfenóxi polioxietanóis (por exemplo, os agentes tensoativos Triton, tais como, Triton X-100 ou Triton N101), ésteres de polioxietileno sorbitano (os agentes tensoativos Tween), éteres polioxietileno, ésteres polioxietileno, etc. Um procedimento de divisão útil emprega os efeitos consecutivos do desoxicolato de sódio e aldeído fórmico e a divisão pode se realizada durante a purificação inicial do vírion (por exemplo, em uma solução gradiente de densidade sacarose). Assim, um processo de divisão ode envolver a clarificação do material contendo vírion (para remover material não vírion), concentração dos vírions colhidos (por exemplo, usando um método de absorção, tal como, absorção de CaHPO_4), separação dos vírions integrais do material não vírion, divisão dos vírions usando um agente de divisão em uma etapa de centrifugação de gradiente de densidade (por exemplo, usando um gradiente de sacarose que contém um agente de divisão, tal como, desoxicolato de

sódio) e então filtração (por exemplo, ultrafiltração) para remover os materiais indesejados. A divisão dos vírions pode geralmente ser ressuspensa na solução de cloreto de sódio isotônica tamponada com fosfato de sódio.

[00126] Vacinas de antígenos de superfície purificados compreendem os antígenos de superfície do Influenza, hemaglutinina e tipicamente também neuraminidase. Os processos para preparação dessas proteínas na forma purificada são também bem conhecidos na arte.

[00127] As cepas do vírus *Influenza* para uso nas vacinas alteram de estação em estação. No período inter-pandêmico corrente, as vacinas incluem tipicamente duas cepas de *Influenza* A (H1N1 e H3N2) e uma cepa de *Influenza* B, as vacinas trivalentes são típicas. A invenção também pode usar HA de cepas pandêmicas (isto é, cepas para as quais o receptor da vacina e a população humana em geral não foram desafiadas anterior e imunologicamente), tais como, cepas dos subtipos H2, H5, H7 e H9 (especificamente do vírus *Influenza* A) e vacinas contra *Influenza* para cepas pandêmicas podem ser monovalentes ou podem ter como base uma vacina trivalente normal suplementada por uma cepa pandêmica. Dependendo da estação específica e da natureza do antígeno incluído na vacina, contudo, a invenção pode proteger contra um ou mais dos subtipos de hemaglutinina dos vírus *Influenza* A que se seguem: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 ou H16.

[00128] As composições da invenção, além de serem apropriadas para imunização contra cepas inter-pandêmicas, são especificamente úteis para imunização contra cepas

pandêmicas. As características de uma cepa *Influenza* que fornecem à mesma o potencial para causar um surto pandêmico são: (a) ela contém uma nova hemaglutinina comparada às hemaglutininas nas cepas humanas em circulação correntemente, isto é, uma que não seja evidente na população humana por mais de uma década (por exemplo, H2) ou não tenha sido anteriormente vista na população humana (por exemplo, H5, H6 ou H9 que tenha sido encontrada apenas na população de pássaros), tal que a população humana seja imunologicamente não desafiada anteriormente com relação à hemaglutinina da cepa; (b) ela seja capaz de ser transmitida horizontalmente na população humana; e (c) seja patogênica aos seres humanos. Um vírus com hemaglutinina do tipo H5 é preferido para imunização contra *Influenza* pandêmico, tal com uma cepa H5N1. Outras cepas possíveis incluem H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 e H7N7 e quaisquer outras cepas pandêmicas potencialmente emergentes. Dentro do subtipo H5, um vírus pode se encontrar na classificação HA 1, classificação HA 1', classificação HA 2 ou classificação HA 3 (World Health Organization (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21), com classificações 1 e 3 sendo especificamente relevantes. Outras cepas cujos antígenos podem geralmente ser utilizados nas composições são cepas que são resistentes à terapia antiviral (por exemplo, resistentes ao oseltamivir e/ou zanamivir), incluindo cepas pandêmicas resistentes.

[00129] As composições da invenção podem incluir antígeno(s) para uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou mais) cepas do vírus *Influenza*, incluindo vírus *Influenza* A e/ou vírus *Influenza* B. Uma vacina trivalente é

preferida, incluindo antígenos de duas cepas de vírus *Influenza* A e uma cepa do vírus *Influenza* B.

[00130] O vírus *Influenza* pode ser uma cepa reessorvente e pode ter sido obtido por técnicas de genética reversa. Assim, um vírus *Influenza* A pode incluir um ou mais segmentos de RNA de um vírus A/PR/8/34 (tipicamente 6 segmentos de A/PR/8/34 com os segmentos HA e N sendo de uma cepa de vacina, isto é, um reessorvente 6:2). Pode também incluir um ou mais segmentos de RNA de um vírus A/WSN/33 ou de qualquer outra cepa de vírus útil para geração de vírus reessorventes para preparação da vacina. Tipicamente, a invenção protege contra uma cepa que é capaz de transmissão humano-a-humano e assim o genoma da cepa geralmente incluirá pelo menos um segmento de RNA que se originou em um vírus *Influenza* de mamífero (por exemplo, em um ser humano). Ele pode incluir o segmento NS que se originou em um vírus *Influenza* aviário.

[00131] HA é um imunógeno principal nas vacinas contra *Influenza* inativadas correntes e doses de vacina são padronizadas por uma referência aos níveis de HA, tipicamente medidos por SRID. As vacinas existentes contêm, tipicamente, cerca de 15 µg de HA por cepa, embora doses inferiores possam ser usadas, por exemplo, para crianças, ou em situações pandêmicas, ou quando se utiliza um adjuvante. As doses fracionais, tais como, $\frac{1}{2}$ (isto é, 7,5 µg de HA por cepa), $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ vêm sendo usadas, como possuindo doses mais altas (por exemplo, doses de 3 x ou 9x). Assim, as vacinas podem incluir entre 0,1 e 150 µg de HA por cepa de *Influenza*, preferivelmente entre 0,1 e 50 µg, por exemplo, 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5

µg, 0,5-5 µg, etc. Doses específicas incluem, por exemplo, cerca de 15, cerca de 10, cerca de 7,5, cerca de 5, cerca de 3,8, cerca de 1,9, cerca de 1,5, etc. por cepa.

[00132] Para vacinas vivas, a dosagem é medida por dose infecciosa de cultura de tecido mediana (TCID₅₀) ao invés de teor de HA, e uma TCID₅₀ entre 10⁶ e 10⁸ (preferivelmente entre 10^{6.5}-10^{7.5}) por cepa é típica.

[00133] HA empregado na invenção pode ser um HA natural como encontrado em um vírus ou pode ter sido modificado. Por exemplo, é conhecida a modificação do HA para remoção dos determinantes (por exemplo, regiões hiperbásicas ao redor do sítio de clivagem entre HA1 e HA2) que fazem com que o vírus seja altamente patogênico nas espécies aviárias.

[00134] Após tratar uma composição contendo vírion para degradar o DNA da célula hospedeira (por exemplo, com BPL), os produtos de degradação são preferivelmente removidos dos vírions, por exemplo, por cromatografia de troca de ânion.

[00135] Uma vez que o vírus influenza tenha sido purificado quanto a uma cepa específica, ele pode ser combinado com os vírus de outras cepas, por exemplo, para fabricar uma vacina trivalente, conforme descrito acima. É preferido tratar cada cepa separadamente e misturar volumes monovalentes para fornecer uma mistura multivalente final, ao invés de misturar os vírus e degradar o DNA de uma mistura multivalente.

General

[00136] O termo "compreendendo" engloba "incluindo" bem como "consistindo", por exemplo, uma composição

"compreendendo" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir alguma coisa adicional, por exemplo X + Y.

[00137] A palavra "substancialmente" não exclui "completamente", por exemplo, uma composição que é "substancialmente isenta" de Y pode ser completamente isenta de Y. Caso necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

[00138] O termo "cerca de" em relação a um valor numérico x representa, por exemplo $x \pm 10\%$.

[00139] Os termos "isolada" e "purificada" significam pelo menos 50% pura, mais preferivelmente 60% pura (como com a maioria das vacinas divididas), mais preferivelmente 70% pura ou 80% pura, ou 90% pura ou 95% pura ou mais de 99% pura.

[00140] A menos que especificamente declarado, um processo compreendendo uma etapa de mistura de dois ou mais componentes não requer qualquer ordem específica de mistura. Assim, os componentes podem ser misturados em qualquer ordem. Onde existem três componentes, então dois componentes podem ser combinados entre si, e então a combinação pode ser conjugada a um terceiro componente, etc.

[00141] Quando materiais de animais (e especificamente bovinos) forem usados na cultura das células, eles devem ser obtidos de fontes que sejam isentas de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) e especificamente isentas de encefalopatia espongiforme bovina (BSE). No geral, é preferido cultivar as células na ausência total de materiais derivados de animais.

[00142] Quando um composto for administrado a um

corpo como parte de uma composição, então aquele composto pode ser alternativamente substituído por um promedicamento apropriado.

[00143] Quando um substrato de célula é usado para procedimentos de ressonância ou genética reversa, é preferível um que tenha sido aprovado para uso em produção de vacina humana, por exemplo, como no Ph Eur General capítulo 5.2.3.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00144] As figuras 1 e 2 mostram os resultados da ampliação da PCR de seis alvos denominados no genoma MDCK. Algumas amostras foram diluídas conforme indicado, até 1:10.000 antes da PCR.

[00145] A figura 3 mostra os resultados da ampliação da PCR de sequências SINE no genoma MDCK. Como nas figuras 1 e 2, o DNA foi algumas vezes diluído antes da PCR. No painel inferior, as figuras ilustram a quantidade de partida de DNA na PCR (fg).

[00146] A figura 4 mostra o efeito do tratamento com BPL no tamanho do DNA MDCK. O DNA genômico foi incubado com BPL em diferentes temperaturas e por períodos de tempo diferentes. A figura 5 mostra resultados semelhantes. Os géis de agarose foram coloridos com SYBRGold.

[00147] A figura 6 mostra eletroforese por capilaridade de DNA residual (linha superior) em relação aos marcadores (linha inferior) possuindo os tamanhos indicados.

MODOS DE REALIZAR A INVENÇÃO

[00148]	Vírus	<i>Influenza</i>	(A/New
	Caledonia/20/99 (H1N1),	A/Panama/2007/99 (H3N2);	

B/Jiangsu/10/2003; A/Wyoming/3/2003 (H3N2)) foram desenvolvidos em células MDCK em uma cultura em suspensão, seguindo-se os ensinamentos dos WO97/37000, WO03/23025 e WO04/92360. O meio de cultura final foi clarificado para prover vírions que foram então submetidos à cromatografia e ultrafiltração/diafiltração. Os vírions no material resultante foram inativados usando β -propiolactona (concentração final de 0,05% v/v; incubada por 16-20 horas a 2-8°C e então hidrolisada para incubar a 37°C por 2-2,5 horas). CTAB foi então empregado para dividir os vírions, e várias etapas de processamento adicionais forneceram uma vacina em volume monovalente final contendo proteínas de superfície purificadas.

[00149] O DNA de MDCK foi caracterizado para avaliar sua quantidade, tamanho e integridade nos três estágios do processo de fabricação: (A) após a etapa de ultrafiltração/diafiltração; (B) após tratamento com β -propiolactona e (C) no volume monovalente final. A eletroforese de gel por capilaridade e a ampliação do ácido nucléico foram usadas para investigar o tamanho, a integridade e a atividade biológica de qualquer DNA genômico residual.

Determinação do Tamanho

[00150] Conforme mencionado acima, o tamanho do DNA da célula hospedeira residual foi analisado nos estágios (A), (B) e (C) por eletroforese do gel por capilaridade. A análise foi realizada em cinco culturas de vírus separadas. Amostras de 500 μ L foram removidas nesses três pontos e tratadas com 10 μ L de proteinase K a 56°C por 16 a 22 horas, seguido por uma extração de DNA total com o Kit

Extrator de DNA (Wako Chemicals) seguindo-se as instruções do fabricante. O DNA foi ressuspenso em 500 µL de água ultrapura para eletroforese em um P/ACE MDQ Molecular Characterization System (Beckman Coulter) a uma temperatura constante de 20°C. Onze marcadores de tamanho molecular foram usados, de 72 a 1.353 pares de base. O limite de detecção do ácido nucléico (DL) para esse método foi de 0,7 pg/mL.

[00151] Com base nos marcadores de tamanho e densidade relativa das faixas de DNA, a distribuição e tamanho dos fragmentos de DNA foram determinados e avaliados para quatro categorias de tamanho diferentes entre variação de < 200 bp à > 1.000 bp. A figura 6 mostra a eletroforese por capilaridade de uma amostra do estágio (C). A análise mostra que todo o DNA residual detecta nessa amostra está substancialmente abaixo de 200 pares de base de comprimento.

[00152] Os resultados ponderados das cinco culturas são mostrados na tabela que se segue:

Estági o	Quantidade de DNA	<200 bp	200-500 bp	500-1.000 bp	>1.000 bp
A	47 mg	25%	12%	6%	55%
B	5 mg	79%	18%	3%	4%
C	0,07 mg	>99%	<DL	<DL	<DL

[00153] O tratamento com BPL assim causa uma redução de -10 vezes na quantidade de DNA, porém também comuta a distribuição para longe das sequências longas na direção de fragmentos pequenos < 200 pares de base. O processamento adicional, entre as etapas (B) e (C), incluindo etapas de cromatografia e ultrafiltração, reduziu os níveis de DNA

total em ~70 vezes e removeram todo DNA detectável ≥ 200 pares de base.

Ampliação do DNA

[00154] A transformação da célula neoplástica é um fenômeno frequentemente associado aos proto-oncogenes modificados e/ou genes supressores de tumor modificados. As sequências de vários genes caninos foram analisadas por PCR antes e após tratamento com BPL, isto é, nos pontos (A) e (B). Além disso, o DNA das células MDCK não infectados foram tratados e testados. Os proto-oncogenes testados foram: H-ras e c-myc. Os genes supressores de tumor testados foram: p53; p21/waf-1; e PTEN. Além disso, as sequências SINE repetitivas foram analisadas por PCR. O alto número de cópias para SINEs facilita a detecção sensível.

[00155] Todas as amostras foram providas com espigões com um DNA de controle externo (fragmento pUC19) para monitoramento da qualidade da preparação da amostra e a PCR. Em todos os experimentos uma ampliação consistente do controle de espigão foi observada, indicando que BPL hidrolisada residual e subprodutos presentes nas misturas da PCR não possuem efeitos inibidores o ensaio e garantiram uma qualidade suficiente da preparação de amostra e da PCR. As amostras foram diluídas em etapas de 10 vezes antes da ampliação, até os produtos da PCR não serem detectados, pelo que, indicando a redução de log nos níveis de DNA. O limite de detecção para o ensaio da PCR é de 55 pg.

[00156] Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese de gel em agarose. A figura 1 mostra os resultados obtidos nas células MDCK não infectadas e a

figura 2 mostra os resultados obtidos durante a cultura do vírus. Todos os seis genes analisados mostraram um forte sinal de ampliação antes do tratamento com BLP, porém a resistência do sinal diminuiu após exposição à BPL. Em todos os lotes de produção testados, o DNA genômico de MDCK residual diminuiu em pelo menos 2 valores de log após exposição à BPL.

[00157] Uma vez que a figura 2 mostra os resultados no estágio (B), antes da purificação adicional, os resultados excedentes representam o DNA presente nas vacinas finais em volume. Devido à sensibilidade quando se utiliza sequências SINE, contudo, a PCR foi também possível no estágio (C), no volume final monovalente. Os resultados dessa análise são mostrados na figura 3. A ampliação do DNA em (A) e (B) foi relativamente semelhante à região SINE, indicando que a BPL é menos ativa em sequências de DNA menores. Mesmo para aquelas sequências menores, contudo, não houve uma redução notável no sinal de ampliação para todas as amostras analisadas. A comparação das intensidades de sinal de PCR entre o ponto de coleta de amostra (B) e (C) reflete a redução do DNA residual devido às etapas de purificação intermediárias.

[00158] A extrapolação da análise com base no gene e com base diretamente na análise com base em SINE, um nível de DNA total de < 1 ng por dose e frequentemente <100 pg por dose é esperado em uma vacina final.

Temperatura

[00159] O tratamento com BPL durante a inativação do vírus teve duas etapas independentes: (1) adição de BPL à mistura contendo vírion a 2-8°C; então (2) elevação da

temperatura a 37°C para hidrólise de BPL. Os efeitos das duas etapas de BLP na inativação do DNA MDCK e fragmentação foram investigados.

[00160] O DNA genômico purificado das células MDCK não infectadas foi tratado com uma concentração final de 0,05% (v/v) BPL a 2-8°C por 16 horas ou a 37°C ou 50°C por até 6 horas e meia. A fragmentação do DNA foi verificada após isso e os resultados são mostrados na figura 4. Esses experimentos revelam a atividade de BPL contra DNA celular, porém as células não infectadas não refletem o estado de MDCK após crescimento viral, uma vez que o DNA celular já está altamente fragmentado devido à apoptose.

[00161] Em 2-8°C, a diferença entre DNA tratado e não tratado em um gel agarose foi insignificante, sugerindo que a fragmentação do DNA por BPL não pode ocorrer substancialmente durante essas condições. Em contraste, o DNA foi muito modificado em ambos 37°C e 50°C com a temperatura maior conduzindo a uma cinética de reação acelerada. O DNA de células não tratadas mostrou uma faixa relativamente distinta em um gel de agarose, com uma leve mancha dos produtos de degradação (figura 5, raia 3). Após um período de incubação curto de BPL a 37°C, contudo, o DNA de MDCK manchou a partir das fendas de gel e a intensidade do sinal de faixa diminuiu (figura 5, raia 2). Os períodos de incubação mais longos resultaram no desaparecimento das moléculas de DNA genômico e melhora da fragmentação do DNA MDCK.

[00162] Nos experimentos adicionais, BPL foi incubada primeiro com células a 4°C por 16 horas. Em uma primeira população, a temperatura foi elevada para 37°C por

2 horas; em uma segunda população, BPL foi removida por filtros centrífugos e então a temperatura foi elevada. Níveis de DNA residual muito mais baixos (>2 log inferior) foram vistos na primeira população.

[00163] Assim, a fragmentação do DNA observada durante o tratamento da BPL parece ocorrer principalmente durante a etapa de hidrólise de BPL a 37°C ao invés de durante a etapa de inativação do vírus a $2-8^{\circ}\text{C}$.

[00164] Será entendido que a invenção foi descrita apenas por meio de exemplos e modificações podem ser feitas, enquanto permaneçam dentro do escopo e espírito da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um produto de cultura de célula que é (a) uma vacina contra o vírus *Influenza* que compreende proteína imunogênicas derivadas de um vírus *Influenza* propagado na cultura de célula, (b) uma vacina contra o vírus *Influenza* formulada em uma forma sub-vírião que compreende proteínas imunogênicas derivadas de um vírus *Influenza* propagado em uma cultura de célula, ou (c) uma formulação que compreende uma proteína recombinante expressa em cultura de célula **caracterizado** pelo fato da referida vacina ou formulação conter menos de 20 ng/mL de DNA de cultura de células residual e o comprimento médio do DNA de cultura de células residual ser inferior a 200 pares de bases;

em que o método compreende as etapas de:

(i) degradação do DNA residual de cultura de célula funcional com β -propiolactona (BPL);

(ii) tratamento do produto de cultura de célula em uma concentração de rompimento de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB); e

(iii) isolamento das proteínas recombinantes ou das proteínas imunogênicas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito DNA da cultura de célula é degradado por tratamento com menos de 0,1% de β -propiolactona (BPL).

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a dita vacina exibe um nível reduzido de agregação.

4. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o produto de cultura de célula é uma vacina contra o vírus *Influenza* e a etapa (ii) compreende romper ou fragmentar o vírus inteiro com uma concentração de rompimento de um tensoativo e a etapa (iii) envolve separar DNA dos vírions.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que a cultura de célula é selecionada do grupo consistindo nas células MDCK, células Vero e células PER.C6.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o produto de cultura de célula é uma vacina contra o vírus *Influenza*, e a vacina é uma vacina dividida ou vacina de uma proteína viral purificada.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que as proteínas imunogênicas são antígenos virais selecionados do grupo consistindo em hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína da membrana (M2), um ou mais dos componentes da transcriptase (PB1, PB2 e PA).

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a proteína imunogênica é hemaglutinina (HA) e/ou neuraminidase (NA).

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** por ainda compreender a etapa de formulação de proteínas imunogênicas em uma vacina.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** por compreender:

- (i) propagação do vírus em uma cultura de célula;
- (ii) adição de β -propiolactona (BPL) para degradação de DNA residual de cultura de célula funcional e também para inativar o vírus;
- (iii) rompimento ou fragmentação de todo o vírus com uma concentração de rompimento de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB);
- (iv) isolamento das proteínas virais; e
- (v) formulação das proteínas virais em vacinas na forma de uma ou mais proteínas virais purificadas.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** por compreender as etapas de:

- (i) propagação do vírus em células de MDCK em suspensão;
- (ii) clarificação do meio de cultura para fornecer vírions;
- (iii) submissão de vírions obtidos na etapa (ii) à cromatografia e ultrafiltração/diafiltração;
- (iv) adição de β -propiolactona (BPL) para degradar DNA residual de cultura de célula funcional e também para inativar os vírions;
- (v) dividir os vírions com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB); e
- (vi) formulação dos vírions divididos em uma vacina.

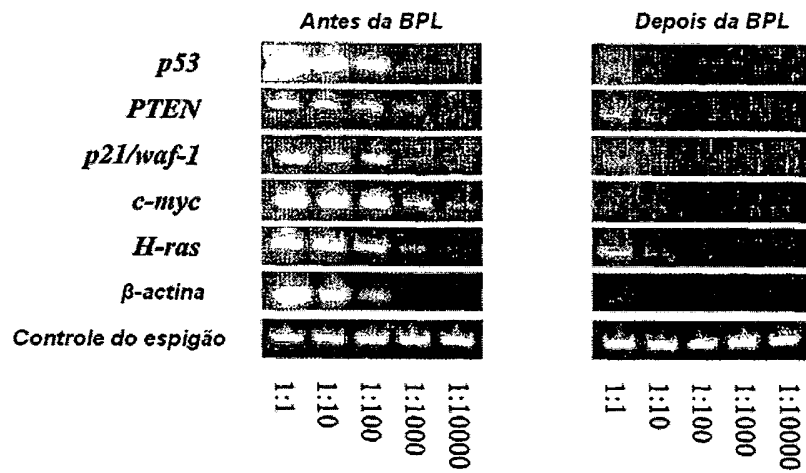
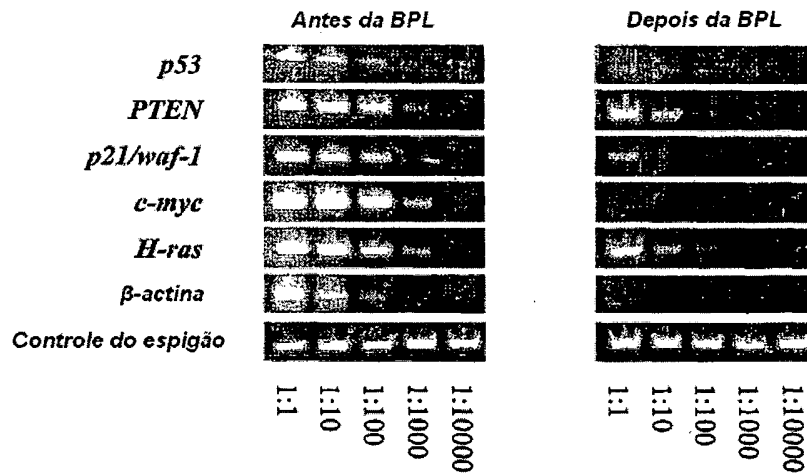
Figura 1**Figura 2****Figura 3**

Figura 4

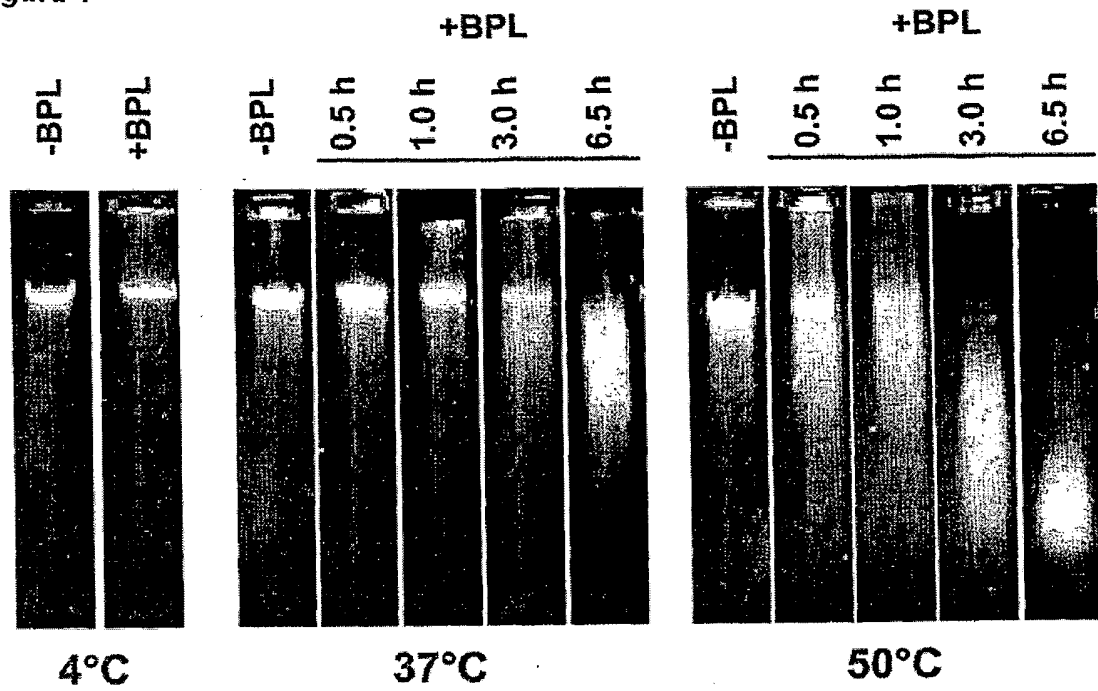


Figura 5



Figura 6