

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2000.09.27	(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. 89, RUE DE L'INSTITUT, 89 B-1330 RIXENSART BE
(30) Prioridade(s): 1999.09.30 GB 9923176	GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, NIEDERLASSUNG DER SMITHKLINE BEECHAM PHARMA GMBH & CO. KG DE
(43) Data de publicação do pedido: 2006.01.25	(72) Inventor(es): ERIK D'HONDT NORBERT HEHME BE DE
(45) Data e BPI da concessão: 2011.02.23 089/2011	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA DE INFLUENZA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA UMA VACINA DE INFLUENZA MONOVALENTE, COMPREENDENDO UMA DOSE BAIXA DE ANTIGÉNIO DE VÍRUS DE INFLUENZA DERIVADO DE OVO DE UMA ESTIRPE DE VÍRUS DE INFLUENZA QUE ESTÁ ASSOCIADA A UM SURTO PANDÉMICO, OU TEM O POTENCIAL PARA ESTAR ASSOCIADA A UM SURTO PANDÉMICO, EM COMBINAÇÃO COM UM ADJUVANTE DE ALUMÍNIO. A INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA KITS VACINAIS, COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE UMA VACINA DE INFLUENZA PARENTÉRICA E MUCOSAL, EM QUE A DOSE COMBINADA DE ANTIGÉNIO É NÃO SUPERIOR À DOSE DE ANTIGÉNIO CONVENCIONAL. TAMBÉM SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DAS VACINAS.

DESCRIÇÃO

"VACINA DE INFLUENZA"

Esta invenção refere-se a novas formulações vacinais, métodos para as preparar e sua utilização em profilaxia ou terapia. Em particular, a presente invenção refere-se a vacinas para administração durante pandemias.

O vírus de influenza é um dos vírus mais ubíquos presentes no mundo, afectando tanto humanos como gado, seguindo um padrão ainda imprevisível de epidemias regulares e pandemias irregulares.

Embora seja frequentemente considerada como uma doença trivial, a influenza pode ter um impacto devastador. Têm sido registados surtos ao longo da história. Sabe-se que ocorreram mais de 30 epidemias ou pandemias mundiais desde 1580, quatro das quais neste século.

Os sintomas habituais de influenza incluem tosse, febre, dor de cabeça e dores musculares. Muitos sofredores desenvolvem complicações ou infecções bacterianas secundárias que podem ser muito sérias e mesmo fatais.

Durante períodos interpandémicos, circulam vírus de influenza que estão relacionados com os da epidemia anterior. Os vírus propagam-se entre pessoas com níveis de imunidade variáveis a partir de infecções anteriores à vida. Tal circulação, durante um período de, habitualmente, 2-3 anos,

promove a selecção de novas estirpes que se alteraram suficientemente de modo a causar de novo uma epidemia entre a população geral; este processo é designado "deriva antigénica". "Variantes de deriva" podem ter diferentes impactos em diferentes comunidades, regiões, países ou continentes em qualquer ano, embora ao longo de vários anos o seu impacto global seja frequentemente semelhante.

Epidemias de influenza típicas causam aumentos na incidência de pneumonia e doença das vias respiratórias inferiores, como testemunhado por taxas aumentadas de hospitalização ou mortalidade. Os idosos ou aqueles com doenças crónicas subjacentes são mais susceptíveis de sofrerem tais complicações, mas as crianças de tenra idade também podem sofrer doença grave.

Em intervalos imprevisíveis, novos vírus de influenza emergem com um antigénio de superfície chave, a hemaglutinina, de um subtipo totalmente diferente das estirpes que circularam na época anterior. Este fenómeno é denominado "desvio antigénico". Pensa-se que, pelo menos no passado, as pandemias tenham ocorrido quando um vírus de influenza de uma espécie diferente, tais como vírus de influenza aviária ou porcina, cruzou a barreira de espécie. Se tais vírus têm o potencial para se propagarem de pessoa para pessoa, podem propagar-se por todo o mundo no espaço de alguns meses a um ano, resultando numa pandemia.

As características de uma estirpe de vírus de influenza que lhe conferem o potencial para causar um surto pandémico são: contém uma nova hemaglutinina comparativamente com a hemaglutinina nas estirpes actualmente em circulação; é capaz de

ser transmitida horizontalmente na população humana e é patogénica para humanos. Uma nova hemaglutinina pode ser uma que não tenha sido evidente na população humana durante um extenso período de tempo, provavelmente um número de décadas, tal como H2. Ou pode ser uma hemaglutinina que não tenha circulado anteriormente na população humana, por exemplo H5, H9 ou H6, que se verificam em aves. Em qualquer caso, a maioria ou, pelo menos, uma grande proporção, ou mesmo toda a população, não encontrou anteriormente o antigénio e é imunologicamente inativa para o mesmo.

Os vírus de influenza H2N2 circularam entre 1957 e 1968 quando foram substituídos pelo subtipo H3N2 que causou a última pandemia do último século. Actualmente, pessoas que estiveram anteriormente expostas a H2N2 estão, provavelmente, acima dos trinta anos de idade. Foi sugerido que um vírus contendo H2 poderia causar uma nova pandemia, em virtude de se dever esperar que uma porção crescente da população mundial que nasceu após 1968 seja imunologicamente inativa. De modo a investigar se esta dicotomia teórica da população em relação à imunidade de H2 é um facto verdadeiro, foi conduzido um estudo sero-epidemiológico em 400 indivíduos e foram medidos anticorpos para H2.

Este estudo foi conduzido na Alemanha e o teste de anticorpo foi realizado em *Sächsische Serumwerk* (Dresden, Alemanha), utilizando um Teste de Inibição de Hemaglutinação (HIT) específico para o antigénio H2. Os títulos são o recíproco da diluição sérica mais elevada que inibe hemaglutinação. Os resultados confirmam o estado imunologicamente inactivo daqueles com menos de 30 anos de idade, uma vez que apenas 7 em 200 indivíduos tinham um título mensurável de anticorpo na gama baixa de 10 a 20.

Os dados mostram, além disso, que uma proporção significativa daqueles com idade superior a 30 anos é ainda seropositiva para H2, 30 anos ou mais após infecção. O número de seropositivos (HIT \geq 10) é 90%. Em algumas das amostras de soro, títulos anti-H2 (HIT) são tão elevados quanto 640 e o título médio geométrico (GMT) foi de 65 para todos os participantes seropositivos em estudo com idade acima de 30 anos. Um HIT \geq 40 é considerado como sendo protector.

Estas observações confirmam a possibilidade de que um vírus H2 poderia propagar-se na população abaixo de 30 anos. Tendo em consideração a demografia actual e o facto de que a população mais jovem do que 30 anos representa uma grande parte da população mundial, é possível que um vírus H2 poderia causar uma pandemia novamente. Esta dicotomia na população mundial irá, adicionalmente, evoluir ao longo dos próximos anos, aumentando o agregado de pessoas susceptíveis.

Há dois anos, influenza com H5 (H5N1), que é um vírus da influenza aviária, foi isolada de humanos em Hong Kong. Contudo, o vírus não foi transmitido de pessoa para pessoa e, assim, não teve a capacidade para causar uma pandemia.

Determinados grupos estão, em geral, em risco acrescido de ficarem infectadas com influenza numa situação pandémica. Os idosos, os cronicamente doentes e as crianças de tenra idade são particularmente susceptíveis mas muitos jovens e pessoas aparentemente saudáveis estão também em risco. Para a influenza H2, a parte da população nascida após 1968 está em risco acrescido. É importante para estes grupos que estejam

eficazmente protegidos tão cedo quanto possível e de um modo simples.

Outro grupo de pessoas que está em risco acrescido são os viajantes. As pessoas viajam mais hoje que alguma vez antes e as regiões onde emerge a maioria dos novos vírus, China e Sudeste Asiático, tornaram-se destinos de viagem populares em anos recentes. Esta alteração nos padrões de viagem possibilita que novos vírus alcancem o globo numa questão de semanas, em vez de meses ou anos.

Deste modo, para estes grupos de pessoas, existe uma necessidade particular para vacinação, de modo a proteger contra a influenza numa situação pandémica ou uma potencial situação pandémica.

Um esforço importante está a ser posto na formação de uma estratégia internacional eficaz para reagir a uma situação pandémica e a Organização Mundial de Saúde é instrumental neste objectivo. Uma medida chave é o desenvolvimento de uma estratégia de vacina pandémica e, até agora, tal não foi alcançado na escala requerida para abordar uma pandemia de gripe.

Foi agora surpreendentemente verificado que vacinas que serão úteis numa situação pandémica, podem ser formuladas rapidamente e num modo específico. Em particular, foi verificado que uma vacina de vírus de influenza de dose baixa contendo vírus purificado, com adjuvante com um veículo tradicional e/ou formulada num modo clássico, que pode ser produzida rapidamente e suficientemente económica para possibilitar a vacinação de populações em grande escala, é eficaz em humanos.

No passado, foram comercialmente utilizadas preparações em bruto de vacina de influenza inactivada intacta, derivada de ovo, com adjuvantes de sais de alumínio. Contudo, o produto era fracamente purificado e bastante reactogénico e a abordagem foi abandonada no final dos anos 70.

Mais recentemente, vacinas de influenza fraccionadas melhor caracterizadas, mais altamente purificadas, foram combinadas com adjuvantes, numa tentativa de melhorar a imunogenicidade em adultos e pessoas mais idosas. Apesar de respostas imunitárias significativamente aumentadas em murgos, um número de abordagens utilizando adjuvantes de nova geração não pôde ser confirmado no homem. Em todos estes estudos, o conteúdo regular de 15 µg de antigénio hemaglutinina foi utilizado para preparar as vacinas formuladas.

Uma referência recente (Kistner et al. (1999) em *Inactivated Influenza Vaccines Prepared in Cell Culture, Dev Biol Stand. Basel, Karger. Vol. 98 p. 101-110*) descreve um estudo em primata, na qual uma vacina derivada de cultura celular contendo três estirpes de influenza misturadas com Al(OH)₃ foi administrada a chimpanzés. Isto induziu uma resposta sistémica que foi tão boa a uma dose de 1,5 µg de hemaglutinina por estirpe quanto aos 15 µg padrão de hemaglutinina por estirpe. Este estudo foi direccionado para o objectivo de desenvolver uma vacina de vírus intacto de influenza derivada de célula Vero que preencha todos os requisitos convencionais da Farmacopeia Europeia, da OMS e outras organizações reguladoras para uma vacina de vírus de influenza.

Para uma vacina de influenza padrão para utilização de rotina podem existir dificuldades associadas à utilização de sais de alumínio como adjuvantes. As vacinas de influenza destinam-se a utilização anual e as injeções repetidas de Al^{3+} podem ser indesejáveis. Mas, para uma situação pandémica que possa ocorrer várias vezes num século, não é excluída a utilização de Al^{3+} .

A presente invenção proporciona, num aspecto, uma composição vacinal compreendendo uma dose baixa de antigénio de vírus de influenza de uma única estirpe de vírus de influenza que está associada a um surto pandémico ou tem o potencial para estar associada a um surto pandémico, em combinação com um adjuvante adequado, em que a referida dose baixa de antigénio é inferior a 15 μg de hemaglutinina por dose ou não superior a 15 μg por dose combinada de vacina e em que o referido adjuvante é um veículo de emulsão de óleo-em-água compreendendo esqualeno, tocoferol alfa e Tween 80. Noutra forma de realização, o referido adjuvante é um veículo de emulsão de óleo-em-água compreendendo esqualeno e tocoferol alfa, numa razão que é igual ou inferior a 1.

A vacina da presente invenção é proporcionada numa dose eficaz, de modo a prevenir a infecção de influenza ou para proporcionar protecção contra influenza, em particular para proporcionar protecção contra morbidade ou mortalidade de influenza.

As formulações vacinais da presente invenção conterão, de um modo preferido, uma quantidade imunoprotectora do antigénio. As formulações vacinais da presente invenção podem ser preparadas por técnicas convencionais.

As composições vacinais da invenção podem ser administradas numa dose única.

A utilização de uma dose baixa de antigénio e a utilização de uma única estirpe de influenza (*i. e.*, uma vacina monovalente) contribui para a velocidade requerida para reagir a uma situação pandémica.

Uma dose baixa de antigénio de vírus de influenza na composição de acordo com a invenção é uma quantidade de antigénio que está abaixo da dose vacinal actualmente aceite para vacinas de influenza humanas, que é 10-15 µg de antigénio hemaglutinina por estirpe, normalmente 15 µg, de acordo com regulamentos, tais como os emitidos pela EMEA na Europa.

Alternativamente, as composições vacinais de acordo com a invenção são administradas em mais de uma dose, particularmente duas doses e, de um modo preferido, duas doses administradas simultaneamente (na mesma ocasião) por vias diferentes. Deste modo, a invenção proporciona um regime de duas doses que compreende a administração tanto de uma vacina sistémica como uma local (mucosal), de um modo preferido, simultaneamente (ou durante uma única visita). A administração de uma vacina mucosal, assim como uma vacina parentérica melhora a resposta imunitária, em particular a resposta de anticorpo IgA, que contribui para protecção de infecção por influenza.

Numa forma de realização preferida, composições vacinais são administradas tanto parentericamente, por exemplo, intramuscularmente, como por meio de uma via mucosal, particularmente intranasalmente. Nesta forma de realização, duas formulações diferentes serão, normalmente, requeridas, isto é,

uma formulação para distribuição parentérica e uma formulação para distribuição mucosal. Estas formulações podem, por exemplo, compreender adjuvantes diferentes e/ou quantidades diferentes de antigénio. Ou as mesmas podem simplesmente compreender diferentes volumes de líquido.

Deste modo, a presente invenção também proporciona um kit compreendendo, pelo menos, os dois componentes seguintes:

(i) uma dose baixa de antigénio de vírus de influenza, formulado com um adjuvante de emulsão de óleo-em-água, como definido nas reivindicações, adequado para administração parentérica; e

(ii) uma dose baixa de antigénio de vírus de influenza para administração mucosal, num dispositivo de distribuição mucosal, tal como um dispositivo de pulverização intranasal,

em que o componente de vírus de influenza que é um antigénio de vírus de influenza de uma estirpe de vírus de influenza que está associada a um surto pandémico, ou tem o potencial para estar associada a um surto pandémico, e em que a dose baixa de antigénio é inferior a 15 µg de hemaglutinina por dose ou não superior a 15 µg por dose combinada de vacina.

Estão comercialmente disponíveis dispositivos de distribuição de pulverização intranasal, por exemplo o dispositivo de distribuição bi-dose da *Pfeiffer GmbH*.

Um tal esquema de administração de duas vias proporcionará uma resposta imunitária sistémica e uma resposta imunitária

local, a última sendo, de um modo preferido, no local normal de entrada do vírus durante infecção (*i. e.*, na mucosa nasal).

De um modo preferido, a dose de antigénio combinada dos dois componentes nesta forma de realização da invenção é inferior aos 10-15 µg convencionais de antigénio hemaglutinina por estirpe.

Deste modo, a dose baixa ou a dose baixa combinada de acordo com a invenção é, geralmente, abaixo de 10 µg de hemaglutinina, de um modo preferido, abaixo de 8 µg de hemaglutinina, de um modo mais preferido, entre 0,1 e 7,5 µg de hemaglutinina, de um modo muito preferido, entre 1 e 5 µg de hemaglutinina por dose vacinal. De um modo preferido, a dose é significativamente mais baixa do que em vacinas de influenza convencionais, de modo a possibilitar a produção de quantidades significativamente superiores de vacina de influenza para uma situação pandémica, do que seria possível utilizando vacina de influenza actual, a níveis de dose actuais. Igualmente, a dose de antigénio necessita de ser suficientemente elevada, de modo a proporcionar uma protecção suficiente.

Em geral, o volume de vacina de acordo com a invenção administrado por meio de uma via parentérica, tal como intramuscularmente, será de cerca de 0,5 mL e o volume de vacina administrado por meio de uma via mucosal, tal como intranasalmente, será um volume mais pequeno, de um modo preferido cerca de 0,2 mL, *e. g.*, 0,1 mL via cada narina.

O antigénio de vírus de influenza na composição vacinal, de acordo com a invenção, necessita de ser obtenível por um método rápido e eficaz, de modo a satisfazer as necessidades de uma

vacina pandémica. Actualmente, o método preferido é através do cultivo de vírus de influenza em ovos e purificação do fluido alantóico recolhido. Os ovos podem ser acumulados em grande número num curto espaço de tempo. Métodos de cultura celular, tais como crescimento do vírus em linhas celulares de rim de cão, tais como células MDCK ou semelhantes a MDCK, ou em células Vero, podem também ser adequados mas não são preferidos no contexto da presente invenção.

O vírus de influenza na composição vacinal é, de um modo preferido, na forma de partículas de vírus intacto mas pode ser, alternativamente, vírus fraccionado preparado por métodos convencionais.

Vacina de vírus fraccionado pode ser preparada por métodos conhecidos na técnica, tal como o processo descrito nas patentes N° DD 300833 e DD 211444. Gripe tradicionalmente fraccionada foi produzida utilizando um tratamento de solvente/detergente, tais como fosfato de tri-*n*-butilo ou éter dietílico em combinação com TweenTM (conhecido como separação "Tween-éter") e este processo ainda é utilizado em algumas instalações de produção. Outros agentes de separação agora empregues incluem detergentes ou enzimas proteolíticas ou sais biliares, por exemplo desoxicolato de sódio, como descrito na patente N° DD 155875. Detergentes que podem ser utilizados como agentes de separação incluem detergentes catiónicos, e. g., brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), outros detergentes iónicos, e. g., laurilssulfato, taurodesoxicolato ou detergentes não iónicos, tais como Triton X-100 (por exemplo, num processo descrito em Lina et al., 2000, *Biologicals* 28, 95-103) e Triton N-101 ou combinações de quaisquer dois ou mais detergentes.

Contudo, uma vantagem de uma vacina de vírus intacto em relação a uma vacina de vírus fraccionado para uma situação pandémica é que evita a incerteza de uma vacina de vírus fraccionado poder ser produzida com sucesso para uma nova estirpe de vírus de influenza. Para algumas estirpes, os detergentes convencionais utilizados para produção do vírus fraccionado podem danificar o vírus e torná-lo inutilizável. Embora exista sempre a possibilidade de utilizar diferentes detergentes e/ou desenvolver um processo diferente para produção de uma vacina fraccionada, isto levaria tempo, que pode não estar disponível numa situação pandémica.

Adicionalmente ao maior grau de certeza com uma abordagem de vírus intacto, existe, também, uma maior capacidade de produção de vacina do que para um vírus fraccionado, uma vez que são perdidas quantidades consideráveis de antigénio durante etapas de purificação adicional, necessárias para preparação de uma vacina fraccionada adequada.

Contudo, para uma abordagem de combinação, na qual uma vacina é administrada tanto intranasalmente como parentericamente, uma vacina fraccionada pode ser preferida para a formulação intranasal, enquanto uma vacina de vírus intacto inactivado pode ser preferida para a formulação parentérica.

Uma particularmente preferida para a formulação intranasal vacina que tenha sido inactivada ou fraccionada e contenha, de um modo preferido, surfactantes não iónicos, tais como detergentes seleccionados dos octilfenoxipolioxietanóis ou nonilfenoxipolioxietanóis (por exemplo, as séries TritonTM comercialmente disponíveis) e ésteres de sorbitano

polioxietileno (séries TweenTM), particularmente, Triton-X-100 ou Tween 80 ou uma combinação de ambos.

Os detergentes podem ser reagentes residuais deixados do processo de separação ou purificação e/ou os mesmos podem ser adicionados à formulação de vírus inactivado/fraccionado ou as suas concentrações ajustadas.

De modo semelhante, agentes de separação, tais como derivados de ácido cólico e, em particular, desoxicolato de sódio (NaDOC), podem estar presentes nas composições vacinais de acordo com a invenção, em geral em quantidades vestigiais.

A utilização de um adjuvante de emulsão de óleo-em-água na composição vacinal de acordo com a invenção permite a utilização de uma dose mais baixa de antigénio de vírus do que em vacinas convencionais.

Para uma vacina administrada mucosalmente é importante garantir que o tamanho dos antigénios virais esteja adaptado à penetração mucosal. Isto pode ser assegurado pelos detergentes ou agentes de separação já presentes na formulação. Alternativamente ou adicionalmente, pode ser empregue um adjuvante mucosal adequado conhecido na técnica, por exemplo, um agente de estimulação de absorção, tal como um éter ou éster de polioxietileno de fórmula geral (I):



em que n é 1-50, A é uma ligação ou -C(O)-, R é alquilo(C₁₋₅₀) ou fenilalquilo(C₁₋₅₀).

Surfactantes preferidos abrangidos pela fórmula (I) são moléculas em que n é 4-24, de um modo mais preferido, 6-12 e, de um modo muito preferido, 9; o componente R é C₁₋₅₀, de um modo preferido, alquilo(C₄-C₂₀) e, de um modo muito preferido, alquilo(C₁₂). Um exemplo particularmente preferido é o éter polioxietileno-9-laurilo (*laureth 9*) que é descrito no índice Merck (12^a Edição: entrada 7717, *Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., EUA; ISBN 0911910-12-3*). O *laureth 9* é formado fazendo reagir óxido de etileno com álcool dodecílico e tem uma média de nove unidades de óxido de etileno.

Num aspecto adicional, a invenção proporciona um método para proporcionar uma resposta imunitária primária contra um vírus de influenza num indivíduo ou população não imunizado, método que compreende a administração ao indivíduo ou população de uma vacina de baixa hemaglutinina ou vacina combinada como aqui se descreve.

Noutro aspecto, a invenção proporciona um método para a produção de uma vacina de influenza para uma situação pandémica, cujo método compreende a mistura de um antigénio de vírus de influenza de uma única estirpe de vírus de influenza que está associada a um surto pandémico ou tem o potencial para estar associada a um surto pandémico, com um adjuvante de emulsão de óleo-em-água, como definido nas reivindicações e o provimento de lotes vacinais que contêm menos de 10 µg de antigénio hemaglutinina de influenza por dose ou inferior a 10 µg por dose combinada.

Ainda noutro aspecto, a divulgação proporciona um processo para purificação do antigénio de vírus de influenza para utilização numa vacina, cujo processo compreende a etapa de

tratamento de uma mistura contendo o antigénio de vírus de influenza com uma protease, de modo a digerir proteínas de vírus não influenza.

A purificação é efectuada numa preparação de vírus de influenza recolhida de uma cultura. Surpreendentemente, as partículas de vírus de influenza são resistentes à etapa de digestão de protease. Uma protease preferida para utilização no método é a tripsina que é utilizada, de um modo preferido, a uma concentração compreendida entre 0,1 - 10 µg/mL de tripsina pura. Enzimas proteases alternativas que podem ser utilizadas incluem plasmina e quimiotripsina.

Normalmente, a etapa de digestão de protease é realizada após o antigénio de vírus de influenza ter sido parcialmente purificado por uma ou mais etapas de separação física, tais como centrifugação e filtração. Se o produto desejado for uma vacina de vírus intacto, a etapa de digestão de protease é efectuada anteriormente a uma etapa de inactivação de vírus.

O método de purificação de acordo com a divulgação pode ser utilizado com sucesso para proporcionar antigénio de vírus de influenza purificado na forma de vírus fraccionado ou intacto substancialmente isento de proteínas de célula hospedeira contaminantes, adequado para utilização numa vacina.

O termo "substancialmente isento de proteínas de célula hospedeira contaminantes" significa que menos de 10%, de um modo preferido, menos de 8% e, de um modo mais preferido, menos de 5% da proteína total é proteína de célula hospedeira, como detectada por rastreio de géis de poliacrilamida corados com Coomassie. No caso de influenza cultivada em ovos, a proteína

de hospedeiro predominante é ovalbumina que perfaz até cerca de 60-70% da massa de proteína total do fluido alantóico. De um modo preferido, a ovalbumina está presente na preparação de vírus de influenza purificado a uma concentração inferior a 1%, de um modo mais preferido, inferior a 0,1% e, de um modo muito preferido, apenas cerca de 0,05% do teor de proteína total, como avaliado através de rastreio de géis corados.

Num aspecto adicional, a invenção proporciona a utilização de uma dose ou uma dose combinada de abaixo de 10 µg, ou abaixo de 8 µg ou de 1 - 7,5 µg, ou de 1 - 5 µg de antigénio hemaglutinina de vírus de influenza de uma única estirpe de influenza associada a um surto pandémico, ou tendo o potencial para estar associada a um surto pandémico e um adjuvante de emulsão de óleo-em-água, como definido nas reivindicações, na preparação de uma vacina para a prevenção de influenza.

Adjuvantes alternativos que são adequados para utilização na composição vacinal de acordo com a invenção incluem uma gama de adjuvantes capazes de melhorarem a resposta imunitária a antigénios de vírus.

O lípido A monofosforilo 3-des-O-acilado (3D-MPL) é um desses adjuvantes. Este está descrito, por exemplo, no documento GB 2220211 (Ribi). Quimicamente é uma mistura de lípido A monofosforilo 3-des-O-acilado com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas e é fabricado pela *Ribi Immunochem Montana*. Uma forma preferida de lípido A monofosforilo 3-des-O-acilado é divulgada no documento EP 0689454. A forma preferida de 3D-MPL é partículas de diâmetro não superior a 120 nm, normalmente 60-120 nm, de um modo preferido, cerca ou menos de 100 nm (como descrito no documento EP 0689454).

3D-MPL estará, habitualmente, presente na gama de 10 µg - 100 µg, de um modo preferido, 25-50 µg por dose, em que o antigénio estará, tipicamente, presente numa gama de 2-50 µg por dose.

Outro adjuvante adequado é QS21, que é uma fracção não tóxica, purificada por HPLC, de uma saponina da casca da árvore Sul-americana *Quillaja Saponaria Molina*. Opcionalmente, esta pode ser misturada com 3D-MPL, opcionalmente em conjunto com um veículo.

Um método para produção de QS21 é descrito no documento US 5057540.

Formulações adjuvantes não reactogénicas contendo QS21 também são adequadas para utilização nas composições vacinais de acordo com a invenção e são descritas, por exemplo, no documento WO 96/33739. Tais formulações compreendendo QS21 e colesterol mostraram ser adjuvantes bem-sucedidos, quando formuladas juntamente com um antigénio.

Combinações de adjuvantes diferentes, tais como aquelas aqui mencionadas acima, também são contempladas como proporcionando um adjuvante que é adequado para utilização na invenção. Por exemplo, QS21 pode ser formulado juntamente com 3D-MPL. A razão de QS21:3D-MPL irá, tipicamente, ser na ordem de 1:10 a 10:1; de um modo preferido, 1:5 a 5:1 e, frequentemente, substancialmente 1:1. A gama preferida para sinergia óptima é 2,5:1 a 1:1 3D-MPL:QS21.

De um modo vantajoso, as composições vacinais, de acordo com a invenção, são formuladas com um veículo de emulsão de

óleo-em-água, habitualmente em combinação com um dos adjuvantes alternativos anteriormente descritos.

Uma emulsão de óleo-em-água preferida compreende um óleo metabolizável, tal como esqualeno, tocoferol alfa e Tween 80. Adicionalmente, a emulsão de óleo em água pode conter span 85 e/ou lecitina.

Num aspecto preferido, hidróxido de alumínio e/ou fosfato de alumínio será adicionado à composição da invenção de modo a melhorar a imunogenicidade.

Tipicamente, para administração humana, QS21 e 3D-MPL estarão presentes numa vacina na gama de 1 µg - 200 µg, tal como 10-100 µg, de um modo preferido, 10 µg - 50 µg, por dose. Tipicamente a emulsão de óleo em água irá compreender de 2 a 10% de esqualeno, de 2 a 10% de tocoferol alfa e de 0,3 a 3% de Tween 80. De um modo preferido, a razão de esqualeno para tocoferol alfa é igual ou inferior a 1, uma vez que esta proporciona uma emulsão mais estável. *Span 85* também pode estar presente a um nível de 1%. Em alguns casos, pode ser vantajoso que as vacinas da presente invenção contenham, adicionalmente, um estabilizador.

Emulsões de óleo em água não tóxicas contêm, de um modo preferido, um óleo não tóxico, e. g., esqualano ou esqualeno, um emulsionante, e. g., Tween 80, num veículo aquoso. O veículo aquoso pode ser, por exemplo, solução salina tamponada com fosfatos.

Uma formulação adjuvante alternativa particularmente potente envolvendo QS21, 3D-MPL e tocoferol numa emulsão de óleo em água é descrita no documento WO 95/17210.

A invenção será, agora, adicionalmente descrita nos exemplos seguintes.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Preparação de volume monovalente para vacina de influenza intacta

O volume vacinal foi preparado de acordo com o fluxograma mostrado na Figura 1A. A Figura 1B mostra um fluxograma generalizado para o processo de purificação, incluindo a etapa opcional de incubação de tripsina.

Produção de vírus intacto monovalente em bruto

Preparação de inóculo de vírus

No dia da inoculação de ovos embrionados é preparado um inóculo fresco através da mistura do lote de sementeira de trabalho com um tampão de fosfatos contendo sulfato de gentamicina a 0,5 mg/mL e hidrocortisona a 25 µg/mL. (dependente de estirpe de vírus)

O inóculo de vírus é mantido a 2-8 °C.

Inoculação de ovos embrionados

São utilizados ovos embrionados com nove a onze dias de idade para replicação de vírus.

Os ovos são incubados nas quintas antes da chegada à instalação fabril e transferidos para as salas de produção após descontaminação das cascas.

Os ovos são inoculados com 0,2 mL do inóculo de vírus num aparelho automático de inoculação de ovos.

Os ovos inoculados são incubados à temperatura apropriada (dependente de estirpe de vírus) durante 48 a 96 horas. No final do período de incubação, os embriões são mortos através de arrefecimento dos ovos e armazenados, durante 12-60 horas, a 2-8 °C.

Recolha

O fluido alantóico dos ovos embrionados arrefecidos é recolhido por máquinas de recolha de ovos apropriadas. Habitualmente, podem ser recolhidos 8 a 10 mL de fluido alantóico em bruto por ovo. Ao volume de vírus monovalente em bruto é adicionado tiomersal a 0,100 mg/mL (num método alternativo, o tiomersal não é adicionado).

Concentração e purificação de vírus intacto de fluido alantóico

1. Clarificação

O fluido alantóico recolhido é clarificado por centrifugação de velocidade moderada (gama: 4000 - 14000 g).

2. Etapa de adsorção

De modo a obter-se um gel de CaHPO_4 no agregado de vírus clarificado, são adicionadas soluções de Na_2HPO_4 a 0,5 mol/L e CaCl_2 a 0,5 mol/L para se atingir uma concentração final de CaHPO_4 de 1,5 g a 3,5 g de CaHPO_4 /litro, dependendo da estirpe de vírus.

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

3. Filtração

O sedimento ressuspemso é filtrado numa membrana filtrante de 6 μm .

4. Centrifugação de gradiente de sacarose

O vírus de influenza é concentrado por centrifugação isopícnica num gradiente linear de sacarose (0,55%). O caudal é 8 - 15 litros/hora.

No final da centrifugação, o conteúdo do rotor é recuperado em três fracções diferentes (a sacarose é medida num refractómetro):

- fracção 1 55-aproximadamente 52% de sacarose
- fracção 2 aproximadamente 52*-26% de sacarose
- fracção 3 26-20% de sacarose*

* dependente de estirpe de vírus

A fracção 2 é diluída com tampão de fosfatos.

Nesta fase, o produto é denominado "concentrado de vírus intacto monovalente".

Filtração estéril

O material de vírus intacto é filtrado em membranas filtrantes, terminando com uma membrana de 0,2 µm. No final da filtração, os filtros são lavados com tampão de fosfatos. Como resultado, o volume final da fracção filtrada é 2 a 5 vezes o volume de fracção original.

Inativação

O material monovalente filtrado é diluído com tampão de fosfatos, de modo a reduzir o teor de proteína total para máx. de 250 µg/mL. É adicionado formaldeído para uma concentração final de 250 µg/mL e a inativação ocorre a 20 °C ± 2 °C durante, pelo menos, 72 horas.

Filtração estéril final

A concentração de proteína do material inativado é ajustada para, aproximadamente, 500 µg/mL de proteína, pré-filtrada em membranas terminando com 0,8 µm e, finalmente, filtrada em membranas terminando com 0,2 µm.

Dependendo da estirpe de vírus, a última membrana de filtração pode ser 0,8 µm. Nesta fase, o produto é denominado: "volume final monovalente".

Armazenamento

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

Pureza

A pureza foi determinada por rastreamento de O.D. de géis de poliacrilamida corados com Coomassie. Os picos foram

determinados manualmente. Os resultados são dados na tabela abaixo:

% de Proteínas Virais (HA, NP, M)					% de outras proteínas virais e derivadas de célula hospedeira
H3N2	Dímero HA	HA1 + 2	NP	M	
A/Syd/5/97	10,34	22,34	25,16	37,33	4,83
A/Nan933/95	8,17	15,8	40,09	30,62	5,32
B					
B/Har/7/94	5,71	24,07	15,64	50	4,58
B/Yam/166/98	0,68	27,62	21,48	46,02	4,2
H1N1					
A/Tex/36/91		33,42	24,46	34,33	7,79
A/Bei/262/95		32,73	35,72	27,06	4,49
H2N2					
A/sing/1/57	2,8	39,7	21,78	32,12	3,6

Método alternativo envolvendo etapa de tripsina

Digestão de tripsina

Após a etapa de filtração estéril, o material estéril é submetido a uma etapa de tripsinização. É adicionada tripsina pura, por exemplo tripsina porcina pura comercialmente disponível, tendo uma actividade específica de 10000 a 15000 unidades/mg, a uma concentração final de 0,1-10 µg/mL. A mistura é incubada durante 2 horas, a 37 °C, agitando

suavemente. O material é, depois, refrigerado, de modo a arrefecer para processamento adicional.

Ultrafiltração

Após digestão de tripsina, o material pode ser submetido a ultrafiltração, quer antes ou após inactivação (como anteriormente descrito).

O material de vírus é ultrafiltrado em membranas com um limite médio de exclusão de 20000 a 50000 D. Durante a ultrafiltração, o conteúdo de formaldeído e sacarose é consideravelmente reduzido.

Após uma primeira redução de volume de 4 vezes, o volume mantém-se constante durante a ultrafiltração (diafiltração) através de adição de tampão de fosfatos e solução salina tamponada com fosfatos.

Resultados

A vacina de vírus intacto de influenza, preparada de acordo com o método de tripsina, foi analisada em géis de poliacrilamida corados com Coomassie. As proteínas virais migraram até à mesma posição que proteínas virais que não passaram por uma etapa da digestão de tripsina, indicando que as proteínas virais não foram digeridas por protease.

Exemplo 2 - Preparação de doses vacinais a partir de volume de vacina

Vacina final é preparada através da mistura de volume de vacina final, preparado como descrito no Exemplo, com mistura de adjuvante e tampão final, de tal modo que o teor de antigénio visado é obtido e uma concentração de 0,5 mg de sais de Al é atingida por dose. O tampão utilizado contém vários sais, como listados abaixo. O adjuvante é uma mistura de AlPO_4 e Al(OH)_3 e é utilizado numa proporção de 3,6 mg de AlPO_4 e 0,4 mg de Al(OH)_3 por 4 mg/mL de solução de reserva.

Composição de tampão:

Água destilada	0,800 L
NaCl	7,699 g
KCl	0,200 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,100 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,600 g
KH_2PO_4	0,373 g

preenchido até um volume final de 1 litro com água destilada.

O processo é como se segue:

1. Utilizar mistura de adjuvante a 10 - 15 °C.
2. Adicionar tampão de vacina final a 15-20 °C e misturar suavemente com agitador magnético.
3. Enquanto se mistura, adicionar o volume de vacina apropriado a 5-10 °C.

4. Continuar a misturar, durante 10 a 30 minutos, à temperatura ambiente.
5. Mover vacina adsorvida para uma câmara frigorífica esperando por enchimento.
6. O volume final de vacina é de 0,5 mL por dose.

Exemplo 3 - Dados clínicos - vacina de influenza fraccionada de dose baixa adjuvanteada com sais de alumínio

Os dados seguintes provêm de um ensaio clínico, em que uma vacina de gripe trivalente foi preparada de acordo com o esquema de preparação geral para a vacina Fluarix (Marca Registada) comercialmente disponível (que é uma vacina de gripe fraccionada). Na prática, o material do volume final trivalente foi misturado com adjuvante de alumínio, como descrito no Exemplo 2. Foram preparadas várias dosagens diferentes de HA.

Os lotes vacinais foram testados em populações de duas idades, 18-60 anos e > 60 anos, a 1,8 µg por dose por estirpe e 3,75 µg por dose por estirpe. Foram vacinados 50 voluntários em cada grupo.

Os dados correspondendo a doses de 1,8 e 3,75 µg por estirpe são apresentados nas tabelas abaixo.

Actividade de Inibição de hemaglutinação (HAI) de Abs séricos específicos de gripe

Os soros (50 µL) são tratados com 200 µL de RDE (enzima de destruição de receptor), durante 16 horas, a 37 °C. A reacção é

interrompida com 150 µL de citrato de Na, a 2,5% e os soros são inactivados, a 56 °C, durante 30 min. É preparada uma diluição 1:10 através de adição de 100 µL de PBS. Depois, é preparada uma diluição em série de 2 vezes em placas de 96 poços (fundo em V) através da diluição de 25 µL de soro (1:10) com 25 µL de PBS. São adicionados 25 µL dos antigénios de referência a cada poço, a uma concentração de 4 unidades de hemaglutinina por 25 µL. As diluições de antigénio e de anti-soro são misturadas utilizando um agitador de placas de microtitulação e incubadas, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. São, depois, adicionados 50 µL de glóbulos vermelhos de galinha (RBC) (0,5 %) e os RBC são deixados a sedimentar, durante 1 hora, a RT. O título de HAI corresponde ao inverso da última diluição sérica que inibe completamente a hemaglutinação induzida por vírus.

	VACINA ADSORVIDA 3,75 µG/DOSE/ESTIRPE			VACINA ADSORVIDA 1,8 µG/DOSE/ESTIRPE		
	H1N1	H3N2	B	H1N1	H3N2	B
Factor de seroconversão						
< 60 anos	5	4,2	2,8	3,5	3,6	2,0
> 60 anos	3,1	3,2	1,6	2,5	3,0	1,8
% de taxa de seroconversão						
< 60 anos	57	5,5	28	51	45	24
> 60 anos	44	4,4	13	38	38	13
% de taxa de protecção						
< 60 anos	89	87	100	82	76	98
> 60 anos	81	71	100	64	67	100

TAXAS PROTECTORAS (%) EM GRUPOS DE 18 - 60 ANOS DE IDADE				
	3,75 µg/dose/estirpe		1,8 µg/dose/estirpe	
	Pré	Pós	Pré	Pós
Contra H1N1	43	89	45	82
Contra H3N2	40	87	24	76
Contra B	85	100	82	98

Os critérios da UE para o grupo de 18-60 anos são como se segue:

- Factor de seroconversão > 2,5
- Taxa de seroconversão > 40%
- Taxa de protecção após vacinação > 70%

A partir dos dados nas tabelas, pode ser concluído que os critérios da UE para o factor de seroconversão, taxa de seroconversão e taxa de protecção são excedidos nas populações de 2 idades para as duas dosagens diferentes testadas contra as estirpes A de influenza.

As taxas de protecção contra o vírus B foram superiores a 80 e 90%, antes de vacinação nos dois grupos de estudo, respectivamente. Esta seropositividade de pré-vacinação para a estirpe B afecta a resposta de vacina negativamente. Apesar disto, os anticorpos para a estirpe B duplicaram após vacinação, resultando numa taxa de protecção próxima de 100%.

Deste modo, uma vacina formulada com menos de 4 µg de HA por estirpe e adjuvante de alumínio tem um perfil de

reactogenicidade aceitável (dados não mostrados) e pode induzir uma resposta imunitária que está em total concordância com todos os três critérios da UE nas duas populações em estudo. Com base nas observações realizadas neste ensaio, pode ser concluído que uma vacina adsorvida de dose baixa é adequada para utilização numa situação pandémica.

Exemplo 4 - Perfil de reactogenicidade de uma vacina de vírus intacto monovalente de dose baixa, purificada e adsorvida sobre sal de alumínio

Foi preparado um volume monovalente de influenza intacta de acordo com o Exemplo 1 e Figura 1 (método de não tripsina) e uma vacina de influenza monovalente foi formulada de acordo com o Exemplo 2.

Na fase de purificação para purificar o vírus intacto, além da centrifugação de gradiente de sacarose geralmente aplicada, a fracção rica em vírus seleccionada foi sedimentada, de modo a remover mais eficientemente contaminantes derivados de ovo.

O vírus intacto foi inactivado com formaldeído a uma concentração de 250 µg/mL (comparativamente com o processo de inactivação para vacina fraccionada que é alcançado por uma combinação de desoxicolato de sódio (NaDOC) e exposição a formaldeído a 50 µg/mL).

Uma vez purificado e inactivado, o antigénio foi adsorvido sobre uma mistura de hidróxido e fosfato de alumínio, a uma concentração de 0,05 mg e 0,45 mg por dose, respectivamente.

A pureza era bastante superior à pureza das vacinas com adjuvantes com vírus intacto do passado, em que era utilizado fluido alantóico simples ou alantóico diluído.

O teor de antigénio do vírus intacto foi de 7,5 µg/dose de A/Sidney/5/97. Esta dosagem foi seleccionada como um cenário de pior caso (como a dosagem de antigénio mais elevada que podia ser seleccionada para uma vacina monovalente pandémica), de modo a investigar o limite superior de reactogenicidade.

Com base nas observações no Exemplo 3 e no facto de que o vírus intacto é, pelo menos, tão imunogénico como a vacina fraccionada, é provável que seja utilizada uma dose de antigénio mais baixa.

Uma comparação estatística da reactogenicidade, principalmente os eventos locais observados após vacinação, foi realizada com dados do *Fluarix*, a vacina de influenza fraccionada da *SmithKline Beecham Biologicals*.

As reacções locais foram seleccionadas para a comparação, em virtude de poderem ser medidas com exactidão e serem mais indicativas para uma reacção local no seguimento de uma vacina contendo adjuvante de alumínio.

ÂMBITO	VACINA FRACCIONADA NÃO ADSORVIDA MONOVALENTE A/SYDNEY (15 µG/DOSE)	VACINA FRACCIONADA NÃO ADSORVIDA MONOVALENTE A/SYDNEY (7,5 µG/DOSE)	VACINA FRACCIONADA ADSORVIDA MONOVALENTE A/SYDNEY (7,5 µG/DOSE)	VACINA INTACTA ADSORVIDA MONOVALENTE A/SYDNEY (7,5 µG/DOSE)
(planeado 4 x 50 n=200) n=196	n=48	n=49	n=50	n=48

RESULTADOS

(%)

Reacções locais e sistémicas	23%	2%	32%	42%
Reacções sistémicas	17%	6%	6%	6%
Reacções locais	27%	33%	42%	19%
Sem reacções	33%	39%	20%	33%

O teste Mann-Whitney U é um teste estatístico para comparação de 2 populações e para testar a hipótese zero de que duas populações de resultados têm funções de distribuição idênticas contra a hipótese alternativa de que as duas funções de distribuição diferem apenas com respeito à localização (mediana), se diferirem.

O resultado da comparação da reactogenicidade da vacina adjuvanteada de vírus intacto de dose baixa monovalente com resultados de ensaios clínicos com *Fluarix* (Marca Registada) em 1996, 1997 e 1999 mostra que não há diferença significativa ao nível de P 0,05.

Esta observação suporta a utilização de uma vacina adjuvanteada de vírus intacto, mesmo a uma dosagem de antigénio superior à dosagem que é suficiente para induzir taxas de protecção elevadas contra influenza.

Exemplo 5 - Imunogenicidade de uma vacina de vírus intacto monovalente de dose baixa adjuvanteada com sais de alumínio numa população não imunizada

Vacina de vírus de influenza intacto foi preparada de acordo com o Exemplo 1 e Figura 1 (método de não tripsina) e vacinas de influenza monovalentes contendo quantidades diferentes de HA foram formuladas como descrito no Exemplo 2.

O antigénio utilizado no estudo foi preparado a partir de A/Singapura/1/57 (H2N2). O subtipo H2N2 não circulou em humanos desde 1968 e participantes do estudo com ≤ 30 anos de idade eram imunologicamente não imunizados para o antigénio. O estado de imunização e a resposta imunitária foram medidos como títulos de inibição de hemaglutinação em amostras séricas.

A resposta imunitária aos dias 10 e 21 pode ser considerada uma resposta de imunização primária verdadeira, enquanto todos os outros valores representam uma resposta de reforço. Os

resultados mostram o título médio geométrico (GMT) do grupo de estudo respectivo.

H2N2	DIA	FLUIDO	ADS	ADS	ADS
		15 µG/DOSE	7,5 µG/DOSE	3,75 µG/DOSE	1,9 µG/DOSE
≤ 30 anos		n=50	n=47	n=48	n=51
	0	5	6	6	6
	10	18	16	18	13
2ª vacin. →	21	26	34	39	25
	42	126	93	95	63

Os resultados apresentados na tabela anterior demonstram que uma vacina de vírus intacto monovalente com um teor de antigénio HA tão baixo quanto 1,9 µg/dose deduz uma resposta imunitária equivalente à do grupo de controlo (15 µg HA/dose, sem alumínio) no grupo de estudo não imunizado (≤ 30 anos, d=10, 21).

Embora os títulos HI sejam abaixo do nível protector após uma imunização, um título protector ($\geq 1:40$) é alcançado em todos os grupos após duas imunizações. Não está firmemente estabelecido se os critérios que foram desenvolvidos para respostas de reforço são completamente aplicáveis na avaliação de uma resposta imunitária primária. O valor de um título “não protector”, no caso de uma infecção com vírus de influenza, continua por ser avaliado.

Estes resultados suportam a utilização de uma vacina de influenza adsorvida em alumínio de vírus intacto, de dose baixa,

para a primeira imunização de uma população não imunizada numa situação pandémica.

Lisboa, 29 de Abril de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Composição vacinal de influenza monovalente, compreendendo um componente de vírus de influenza que é uma dose baixa de antigénio de vírus de influenza de uma estirpe de vírus de influenza que está associada a um surto pandémico ou tem o potencial para estar associada a um surto pandémico, em combinação com um adjuvante adequado, em que a referida dose baixa de antigénio é inferior a 15 µg de hemaglutinina por dose ou não superior a 15 µg por dose combinada de vacina e em que o referido adjuvante é um veículo de emulsão de óleo-em-água compreendendo esqualeno, tocoferol alfa e Tween 80.
2. Composição vacinal de influenza monovalente de acordo com a reivindicação 1, em que esqualeno e tocoferol alfa estão numa razão que é igual ou inferior a 1.
3. Composição vacinal de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 2, em que o antigénio de vírus de influenza está na forma de vírus de influenza intacto purificado ou na forma de um vírus de influenza fraccionado.
4. Composição vacinal de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que a referida emulsão de óleo-em-água compreende de 2 a 10% de esqualeno, de 2 a 10% de tocoferol alfa e de 0,3 a 3% de Tween 80.
5. Composição vacinal de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que a referida emulsão de óleo-em-

água adicionalmente compreende monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) ou QS21.

6. Composição vacinal de acordo com a reivindicação 5, em que 3D-MPL e QS-21 estão presentes numa gama de 1 µg - 100 µg, de um modo preferido, 10 µg - 50 µg por dose.
7. Composição vacinal de acordo com a reivindicação 5 ou reivindicação 6, em que 3D-M PL e QS-21 estão ambos presentes e em que a razão de 3D-MPL:QS21 é 2,5:1 a 1:1.
8. Composição vacinal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, na qual a dose baixa de antigénio é inferior a 10 µg de hemaglutinina por dose ou por dose combinada de vacina.
9. Composição vacinal de acordo com a reivindicação 8, na qual a dose de antigénio é entre 0,1 e 7,5 µg ou entre 1 e 5 µg de hemaglutinina por dose ou por dose combinada de vacina.
10. Composição vacinal como reivindicada em qualquer das reivindicações 1 a 9 que é derivada de ovo ou derivada de cultura celular.
11. Composição vacinal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o antigénio de vírus de influenza está substancialmente isento de contaminação de célula hospedeira.
12. Composição vacinal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que o componente de vírus de influenza é purificado por um método que inclui uma etapa

de incubação de protease, de modo a digerir proteínas de vírus não influenza.

13. Kit compreendendo:

(i) uma dose baixa de antigénio de vírus de influenza, formulado com um adjuvante como definido em qualquer das reivindicações 1 a 7, para administração parentérica; e

(ii) uma dose baixa de antigénio de vírus de influenza para administração mucosal, num dispositivo de distribuição mucosal, tal como um dispositivo de pulverização intranasal,

em que o componente de vírus de influenza é um antigénio de vírus de influenza de uma estirpe de vírus de influenza que está associada a um surto pandémico ou tem o potencial para estar associada a um surto pandémico, e em que a dose baixa de antigénio é inferior a 15 µg de hemaglutinina por dose ou não superior a 15 µg por dose combinada de vacina.

14. Kit de acordo com a reivindicação 13, em que a dose combinada de antigénio é inferior a 10 µg de hemaglutinina.

15. Kit de acordo com a reivindicação 13 ou reivindicação 14, em que o antigénio de influenza em (i) é vírus intacto inactivado e o antigénio de influenza em (ii) é vírus fraccionado.

16. Método para a produção de uma vacina de influenza para uma situação pandémica, cujo método compreende a mistura de um antigénio de vírus de influenza de uma única estirpe de

vírus de influenza que está associada a um surto pandémico, ou tem o potencial para estar associada a um surto pandémico, com um adjuvante como definido em qualquer das reivindicações 1 a 7 e o provimento de lotes vacinais ou kits vacinais que contêm menos de 10 µg de antigénio hemaglutinina de influenza por dose ou não superior a 15 µg de hemaglutinina por dose combinada.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o antigénio é altamente purificado.
18. Método de acordo com a reivindicação 16 ou reivindicação 17, em que o antigénio de vírus de influenza está na forma de partículas de vírus de influenza intacto ou fraccionado.
19. Composição vacinal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o antigénio de influenza é seleccionado de um antigénio H2, tal como H2N2 e um antigénio H5, tal como H5N1.
20. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, em que o antigénio de influenza é seleccionado de um antigénio H2, tal como H2N2 e um antigénio H5, tal como H5N1.
21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, em que o antigénio de influenza é seleccionado de um antigénio H2, tal como H2N2 e um antigénio H5, tal como H5N1.
22. Utilização de menos de 10 µg, ou menos de 8 µg, ou de 1 - 7,5 µg ou de 1 - 5 µg de antigénio hemaglutinina de

vírus de influenza derivado de ovo de uma única estirpe de influenza associada a um surto pandémico ou tendo o potencial para estar associada a um surto pandémico, em combinação com um adjuvante como definido em qualquer das reivindicações 1 a 7, na preparação de um lote vacinal ou um kit vacinal para protecção contra infecção de vírus de influenza.

23. Utilização de acordo com a reivindicação 22 para administração como dose única ou em mais de uma dose, tal como duas doses.
24. Utilização de não mais de 15 µg, ou menos de 10 µg, ou menos de 8 µg, ou de 1 - 7,5 µg ou de 1 - 5 µg de antigénio hemaglutinina de vírus de influenza derivado de ovo de uma única estirpe de influenza associada a um surto pandémico, ou tendo o potencial para estar associada a um surto pandémico, na preparação de uma vacina de duas doses para administração simultânea parentérica e mucosal, em que a hemaglutinina para administração parentérica foi formulada com um adjuvante como definido em qualquer das reivindicações 1 a 7.

Lisboa, 29 de Abril de 2011

Fig 1 A

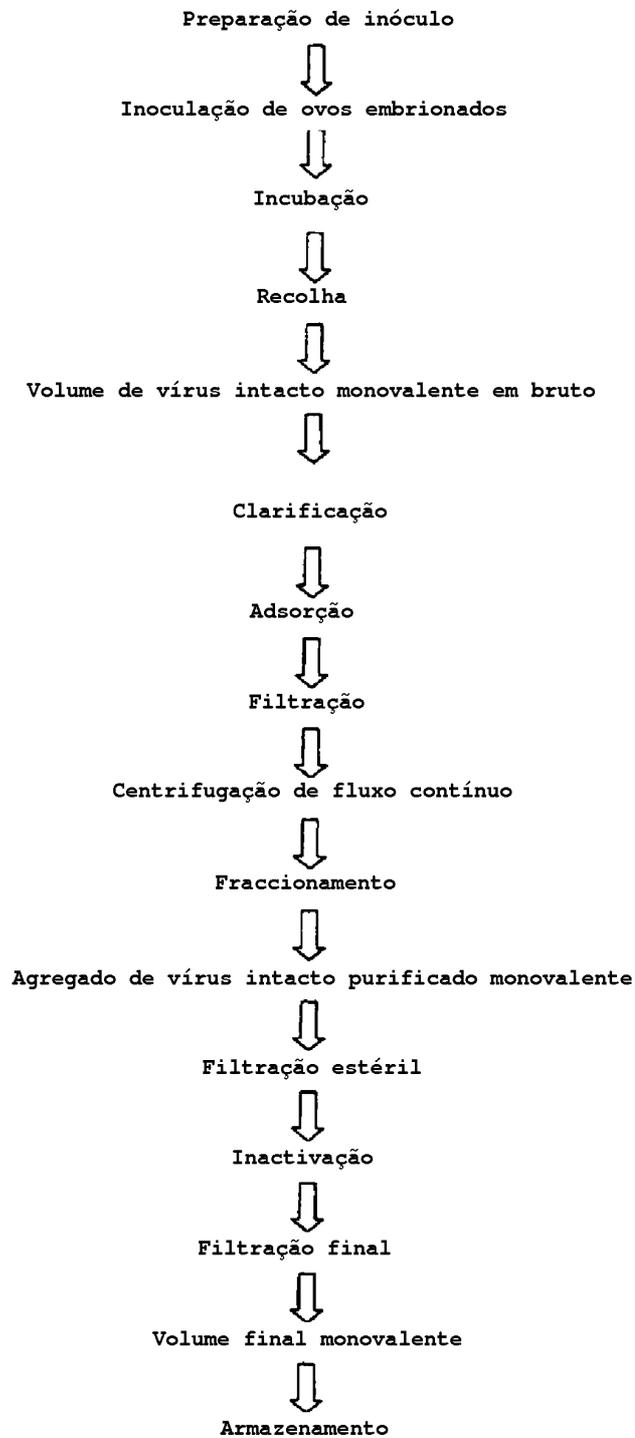
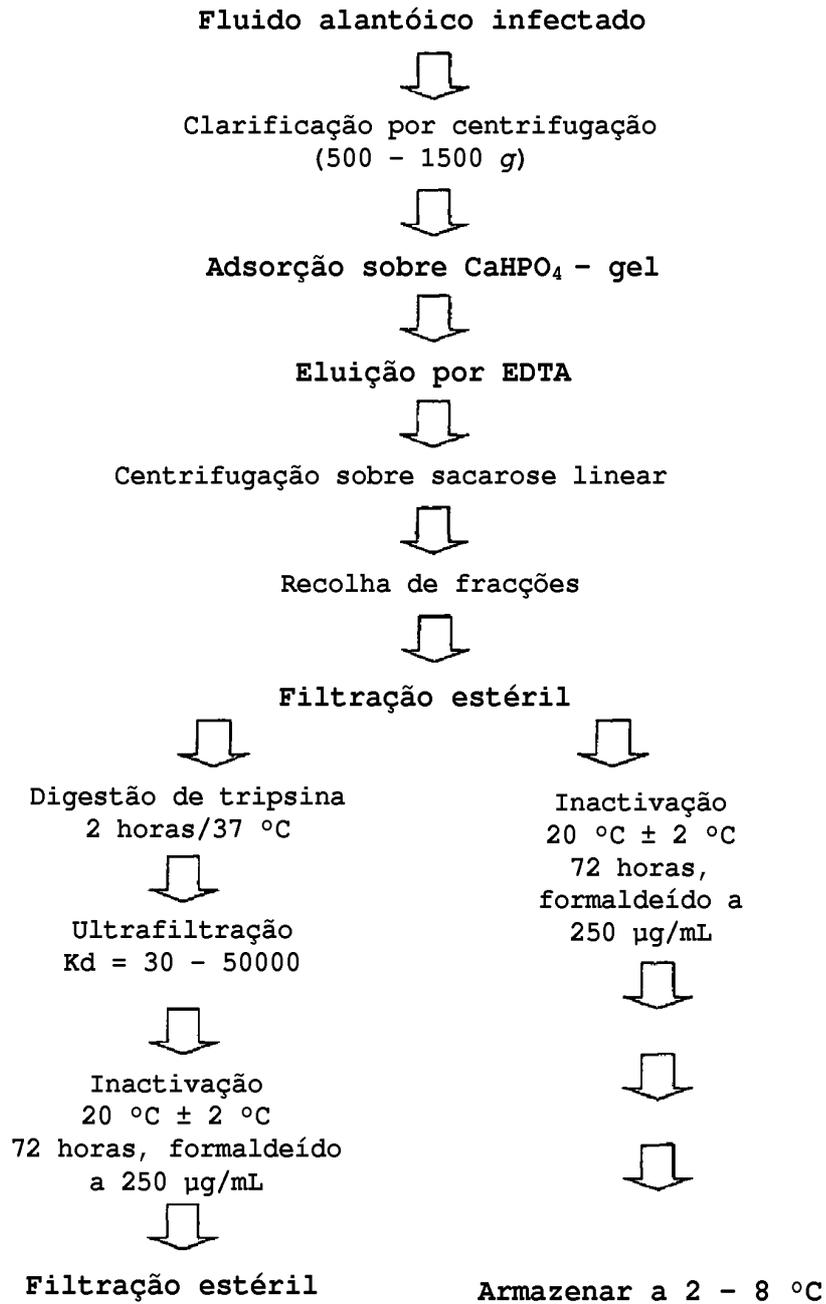


Fig 1 B

Processo a jusante



RESUMO

"VACINA DE INFLUENZA"

A invenção proporciona uma vacina de influenza monovalente, compreendendo uma dose baixa de antigénio de vírus de influenza derivado de ovo de uma estirpe de vírus de influenza que está associada a um surto pandémico, ou tem o potencial para estar associada a um surto pandémico, em combinação com um adjuvante de alumínio. A invenção também proporciona kits vacinais, compreendendo uma combinação de uma vacina de influenza parentérica e mucosal, em que a dose combinada de antigénio é não superior à dose de antigénio convencional. Também são proporcionados métodos para preparação das vacinas.