

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 761**

51 Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08736288 .5**
96 Fecha de presentación: **16.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2136837**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **Vacuna contra la gripe de emulsión de aceite en agua**

30 Prioridad:
20.04.2007 GB 0707697
12.06.2007 GB 0711357
21.06.2007 GB 0712062
10.10.2007 WO PCT/EP2007/060743
18.12.2007 GB 0724651

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

73 Titular/es:
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
RUE DE L'INSTITUT, 89
1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:
BALLOU, William Ripley y
HANON, Emmanuel Jules

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 761 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra la gripe de emulsión de aceite en agua

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas de la gripe y a pautas de vacunación para
 10 inmunizar seres humanos contra la enfermedad de la gripe, a su uso en medicina, en particular a su uso en
 aumentar respuestas inmunitarias a diversos antígenos, y a procedimientos de preparación. En particular, la
 invención se refiere a vacunas contra la gripe que comprenden un antígeno del virus de la gripe o preparación
 antigénica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en las que dicho adyuvante de
 emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable y un agente emulsionante, y opcionalmente un tocol
 y/o un esteroide.

Antecedentes técnicos

Los virus de la gripe son uno de los virus más ubicuos presentes en el mundo, afectando tanto a seres humanos
 como a ganado. La gripe produce una carga económica, morbilidad e incluso mortalidad, que son significativos.

15 El virus de la gripe es un virus envuelto de ARN con un tamaño de partícula de aproximadamente 125 nm de
 diámetro. Consiste básicamente en una nucleocápside interna o núcleo de ácido ribonucleico (ARN) asociado a
 nucleoproteína, rodeado por una envuelta vírica con una estructura de bicapa lipídica y glucoproteínas externas. La
 capa interna de la envuelta vírica está compuesta predominantemente de proteínas de la matriz y la capa externa
 20 principalmente de material lipídico derivado de huésped. El virus de la gripe comprende dos antígenos de superficie,
 las glucoproteínas neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA), que aparecen como espículas, 10 a 12 nm de longitud,
 en la superficie de las partículas. Son estas proteínas de la superficie, particularmente la hemaglutinina, las que
 determinan la especificidad antigénica de los subtipos de la gripe. Las cepas del virus se clasifican según especies
 huésped de origen, sitio geográfico y año de aislamiento, número de serie y, para la gripe A, por propiedades
 25 serológicas de los subtipos de HA y NA. Se han identificado 16 subtipos de HA (H1-H16) y nueve subtipos de NA
 (N1-N9) para los virus de la gripe A [Webster RG y col. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev.
 1992;56:152-179; Fouchier RA y col. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16)
 Obtained from Black-Headed Gulls. J. Virol. 2005;79:2814-2822]. Los virus de todos los subtipos de HA y NA se han
 recuperado de aves acuáticas, pero sólo tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos subtipos de NA (N1 y N2) han
 establecido linajes estables en la población humana desde 1918. Sólo un subtipo de HA y uno de NA son
 reconocidos por los virus de la gripe B.

30 Los virus de la gripe A han evolucionado y experimentan continuamente variabilidad antigénica [Wiley D, Skehel J.
 The structure and the function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. Ann. Rev. Biochem.
 1987;56:365-394]. Una falta de corrección eficaz por la ARN polimerasa vírica conduce a una alta tasa de errores de
 transcripción que pueden producir sustituciones de aminoácidos en glucoproteínas de la superficie. Esto se llama
 "desviación antigénica". El genoma vírico segmentado permite un segundo tipo de variación antigénica. Si dos virus
 35 de la gripe infectan simultáneamente una célula huésped, el reagrupamiento genético, llamado "desplazamiento
 antigénico" puede generar un virus novedoso con nuevas proteínas de la superficie o internas. Estos cambios
 antigénicos, tanto 'desviaciones' como 'desplazamientos', son impredecibles y pueden tener un espectacular impacto
 desde un punto de vista inmunológico ya que eventualmente conducen a la emergencia de nuevas cepas de la gripe
 y que permiten que el virus escape del sistema inmunitario causando las bien conocidas (epidemias), casi anuales.
 40 Ambas de estas modificaciones genéticas han producido nuevas variantes víricas responsables de pandemias en
 seres humanos.

La desviación antigénica del virus de la gripe B es menos frecuente que en las cepas A y el desplazamiento
 antigénico es desconocido. Aunque linajes antigénicamente distintos (normalmente dos, por ejemplo B/Yamagata y
 B/Victoria) de la gripe B pueden co-circular ocasionalmente, con proporciones variables de año a año y país a país,
 45 es usual que las vacunas contra la gripe contengan sólo una cepa de la gripe B.

La HA es el antígeno más importante en la definición de la especificidad serológica de las diferentes cepas de la
 gripe. Esta proteína de 75-80 kD contiene numerosos determinantes antigénicos, varios de los cuales están en
 regiones que experimentan cambios de secuencia en diferentes cepas (determinantes específicos de cepa) y otros
 en regiones que son comunes a muchas moléculas de HA (comunes a determinantes).

50 Los virus de la gripe producen epidemias casi cada invierno, con tasas de infección para el virus de tipo A o B de
 hasta el 40% durante un periodo de seis semanas. La infección de la gripe produce diversos estados de
 enfermedad, desde una infección subclínica pasando por una infección respiratoria superior leve a neumonía vírica
 grave. Las epidemias de la gripe típicas producen aumentos en la incidencia de neumonía y enfermedad respiratoria
 baja como demuestra el aumento de las tasas de hospitalización o mortalidad. La gravedad de la enfermedad se
 55 determina principalmente por la edad del huésped, su estado inmunitario y el sitio de infección.

Las personas mayores, 65 años de edad y más, son especialmente vulnerables, representando el 80-90% de todas
 las muertes relacionadas con la gripe en países desarrollados. Los individuos con enfermedades crónicas

subyacentes o con una respuesta inmunitaria alterada también tienen gran probabilidad de experimentar tales complicaciones. Los lactantes jóvenes también pueden sufrir enfermedad grave. Por tanto, estos grupos necesitan protegerse en particular. Además de estos grupos 'en riesgo', las autoridades sanitarias también están recomendando vacunar al personal sanitario.

- 5 La vacunación desempeña una función crítica en controlar las epidemias de la gripe anuales. Vacunas contra la gripe actualmente disponibles son tanto la vacuna de la gripe inactivada como la atenuada viva. Las vacunas de la gripe inactivadas están compuestas por tres formas posibles de preparación de antígeno: virus completo inactivado, subviriones en los que partículas de virus purificadas son rotas con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envoltura lipídica (la llamada vacuna "fraccionada") o HA y NA purificadas (vacuna de subunidad). Estas vacunas
10 inactivadas se administran intramuscularmente (i.m.), subcutáneamente (s.c), o intranasalmente (i.n.).

Las vacunas contra la gripe para uso interpandémico, de todos los tipos, son normalmente vacunas trivalentes. Generalmente contienen antígenos derivados de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa de la gripe B. Una dosis inyectable estándar de 0,5 ml en la mayoría de los casos contiene (al menos) 15 µg de componente de antígeno de hemaglutinina de cada cepa, como se mide por inmunodifusión radial simple (SRD) (J.M. Wood y col.:
15 An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza hemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J. Biol. Stand.* 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of hemagglutinin antigen of influenza virus. *J. Biol. Stand.* 9 (1981) 317-330). También se ha informado de vacunas tetravalentes que contienen, además de las tres cepas clásicas, una cepa de B adicional (*Commun Dis Intell* 2006,
20 30, 350-357) o una cepa H3N2 adicional (*Vaccine* 1992, 10, 506-511).

Las cepas del virus de la gripe interpandémica que van a incorporarse en la vacuna contra la gripe cada temporada son determinadas por la Organización mundial de la salud en colaboración con las autoridades sanitarias nacionales y los fabricantes de vacunas. Las vacunas contra la gripe interpandémica actualmente disponibles se consideran seguras en todos los grupos de edad (De Donato y col. 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101).

- 25 Sin embargo, la eficacia de la vacuna está afectada por la edad y el estado inmunitario de los receptores y la coincidencia entre vacuna y cepas de la gripe en circulación. Hay pocas pruebas de que las presentes vacunas contra la gripe funcionen en niños pequeños de menos de dos años de edad. Además, las tasas informadas de eficacia de la vacuna para la prevención de enfermedad de la gripe confirmada típica son del 23-72% para los ancianos, que son significativamente inferiores a las tasas de eficacia del 60-90% informadas para adultos más
30 jóvenes (Govaert, 1994, *J. Am. Med. Assoc.*, 21, 166-1665; Gross, 1995, *Ann Intern. Med.* 123, 523-527). Se ha mostrado que la eficacia de una vacuna contra la gripe establece una correlación entre títulos en suero de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HI) y la cepa vírica, y varios estudios han encontrado que adultos mayores presentan menores títulos de HI después de la inmunización contra la gripe que los adultos jóvenes (Murasko, 2002, *Experimental gerontology*, 37, 427-439).

- 35 A modo de antecedentes, durante los periodos interpandémicos, los virus de la gripe que circulan están relacionados con los de la epidemia precedente. Los virus se propagan entre personas con niveles variables de inmunidad de infecciones anteriores en la vida. Tal circulación, durante un periodo de normalmente 2-3 años, promueve la selección de nuevas cepas que han cambiado suficientemente para producir de nuevo una epidemia entre la población general; este procedimiento se llama 'desviación antigénica'. Las 'variantes de desviación' pueden tener
40 diferentes impactos en diferentes comunidades, regiones, países o continentes en un año cualquiera, aunque a lo largo de varios años su impacto global es frecuentemente similar. Las epidemias de la gripe típicas producen aumentos en la incidencia de neumonía y enfermedad respiratoria baja como demuestra el aumento de las tasas de de hospitalización o mortalidad. Los ancianos o aquellos con enfermedades crónicas subyacentes tienen gran probabilidad de experimentar tales complicaciones, pero los lactantes jóvenes también pueden sufrir enfermedad
45 grave.

- A intervalos impredecibles, virus de la gripe novedosos emergen con un antígeno de superficie clave, la hemaglutinina, de un subtipo totalmente diferente de cepas que circularon la estación anterior. Aquí, los antígenos resultantes pueden variar del 20% al 50% de la proteína correspondiente de cepas que estuvieron previamente
50 circulando en seres humanos. Este fenómeno, llamado "desplazamiento antigénico", puede hacer que el virus escape de la 'inmunidad de grupo' y establezca pandemias. En otras palabras, una pandemia de la gripe se produce cuando aparece un nuevo virus de la gripe contra el que la población humana no tiene inmunidad. Se cree que al menos las pasadas pandemias se han producido cuando un virus de la gripe de una especie diferente, tal como un virus de la gripe aviar o porcina, ha cruzado la barrera de especies. Si tales virus tienen la posibilidad de propagarse de ser humano a ser humano, pueden propagarse mundialmente dentro de unos pocos meses a un año,
55 produciendo una pandemia. Por ejemplo, en 1957 (pandemia de la gripe asiática), los virus del subtipo H2N2 sustituyeron a los virus H1N1 que habían estado circulando en la población humana desde al menos 1918 cuando se aisló por primera vez el virus. La HA de H2 y la NA de N2 experimentaron desviación antigénica entre 1957 y 1968 hasta que la HA fue sustituida en 1968 (pandemia de la gripe de Hong-Kong) por la aparición del subtipo de la gripe H3N2, después de lo cual la NA de N2 continuó desviándose junto con la HA de H3 (Nakajima y col., 1991,
60 *Epidemiol. Infect.* 106, 383-395).

Se han realizado varios estudios clínicos para evaluar la seguridad e inmunogenicidad en poblaciones sin sensibilizar con vacunas candidatas monovalentes que contienen una cepa pandémica tal como las cepas H2N2 o H9N2 no circulantes. Los estudios han investigado formulaciones de virus fraccionados o completos de diversas concentraciones de HA (1,9, 3,8, 7,5 ó 15 µg de HA por dosis), con o sin adyuvantación de alumbre. Los virus de la gripe del subtipo H2N2 circularon de 1957 hasta 1968 cuando fueron sustituidos por las cepas H3N2 durante la 'pandemia de Hong Kong'. Hoy en día, los individuos que nacieron después de 1968 no han recibido tratamiento inmunológico previo a cepas H2N2. Se ha mostrado que estos candidatos a vacuna eran inmunogénicos y bien tolerados. Los resultados se informan en Hehme, N y col. 2002, *Med. Microbiol. Immunol.* 191, 203-208; en Hehme N. y col. 2004, *Virus Research* 103, 163-171; y se informó de dos estudios con H5N1 (Bresson JL y col. *The Lancet.* 2006:367 (9523):1657-1664; Treanor JJ y col. *N Engl J Med.* 2006;354:1343-1351). Otros estudios han informado de resultados con vacunas contra la gripe adyuvantadas con MF59. Un estudio ha informado de que dos dosis de una vacuna contra la gripe H5N3 adyuvantada con MF59 estaba reforzando la inmunidad a la gripe H5N1 en una población sensibilizada (Stephenson y col., *Vaccine* 2003, 21, 1687-1693) y otro estudio ha informado de respuestas de anticuerpos reactivas de forma cruzada a virus H5N1 obtenidos después de tres dosis de vacuna contra H5N3 de la gripe adyuvantada con MF59 (Stephenson y col., *J. Infect. Diseases* 2005, 191, 1210-1215).

Las personas en riesgo en caso de una pandemia de la gripe pueden ser diferentes de los grupos de riesgo definidos para complicaciones debidas a la gripe estacional. Según la OMS, el 50% de los casos humanos producidos por la cepa H5N1 de la gripe aviar se produjeron en personas de menos de 20 años, el 90% se produjeron entre aquellos de edad < 40. (OMS, parte epidemiológico semanal, 30 de junio de 2006).

Durante una pandemia, los fármacos antivíricos pueden no ser suficientes o eficaces para cubrir las necesidades y el número de individuos en riesgo de la gripe será mayor que en periodos interpandémicos, por tanto es esencial el desarrollo de una vacuna adecuada con la posibilidad de producirse en grandes cantidades y con distribución eficiente y potencial de administración. Una forma sería liberar rápidamente alguna capacidad de producción para la producción de la vacuna contra la gripe pandémica. Sin embargo, ya que la vacunación colectiva sólo empezaría después de la aparición de la pandemia, esto produciría de cualquier forma retrasos importantes por el tiempo necesario para identificar la cepa y para producir el primer lote. Además, habrá una producción semanal fija y, por tanto, limitada por los fabricantes de vacunas. Esto significa que el presente enfoque dejará casi con seguridad grandes partes de la población globalmente sin proteger cuando ataca la pandemia. La vacuna estaría disponible demasiado tarde para grandes partes de la población y se anticipa que la mortalidad sería demasiado alta con una estimación de 180-360 millones de muertes globalmente.

Una forma para tratar este presente dilema es generar una vacuna pandémica de antemano a partir de una pandemia y diseñar una vacuna monovalente con la "mejor cepa pandémica candidata" en lugar de vacunas trivalentes en un intento por reducir el volumen de vacunas, principalmente ya que dos dosis de vacuna pueden ser necesarias con el fin de lograr niveles de anticuerpos protectores en receptores que no han recibido previamente tratamiento inmunológico (Wood JM y col. *Med Microbiol Immunol.* 2002;191:197-201. Wood JM y col. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356:1953-1960). Entonces, esta vacuna se usaría para almacenar o para sensibilizar a la población durante el periodo interpandémico.

Desafortunadamente, como las presentes instalaciones de producción están completamente ocupadas todo el año con la producción de vacunas trivalentes estacionales para la vacunación anual en los hemisferios norte y sur, ambos enfoques mencionados anteriormente no son factibles debido a que no hay capacidad de producción adicional para producir esa "mejor cepa pandémica candidata". Además, debe observarse que hay una necesidad urgente de encontrar una solución que haga frente a las escaseces de vacunas interpandémicas contra la gripe que regularmente se encuentran durante las estaciones de la gripe anuales. Una solución podría ser construir capacidad de producción adicional, sin embargo esto requeriría varios años de construcción, que es de cualquier forma un enfoque inadecuado en caso de un ataque pandémico dentro de los próximos años.

Actualmente, la única forma para ganar rápidamente capacidad adicional sería acortar el tiempo de producción para la vacuna trivalente anual. Las escaseces recurrentes de vacunas contra la gripe se producen cada estación en la mayoría de los países que excluyen una cobertura óptima de la población considerada como de alto riesgo para desarrollar la grave enfermedad de la gripe y complicaciones. Como la producción de antígeno es el factor limitante de la velocidad en la producción de vacunas contra la gripe, tienen que explorarse estrategias de ahorro de antígeno alternativas.

Algunos enfoques se basan en la adyuvantación, cuyo objetivo es aumentar la inmunogenicidad de la vacuna con el fin poder disminuir el contenido de antígeno (ahorro de antígeno) y, por tanto, aumentar el número de dosis de vacunas disponibles. El uso de un adyuvante también puede reducir la posible inmunogenicidad débil del antígeno en una población sin tratamiento previo. Se han publicado varios enfoques. Se han mostrado ejemplos que usan virus H2N2 o H9N2 inactivado completo adyuvantado con sal de aluminio (N. Hehme y col. *Virus Research* 2004, 103, 163-171) o que usan una vacuna contra H5N1 de subvirión simple o vacuna contra el virus H5N1 fraccionado adyuvantada con hidróxido de aluminio (Bresson JL y col. *The Lancet.* 2006:367 (9523):1657-1664; Treanor JJ y col. *N Engl J Med.* 2006;354:1343-1351). Los resultados de este último ensayo indican que tanto las vacunas contra el virus H5N1 simples como adyuvantadas son seguras hasta una dosis de antígeno de 90 µg (probada sólo como vacuna de subvirión simple). Sin embargo, usando una alta dosis tal de antígeno no es compatible con una

estrategia de ahorro de antígeno que se ha vuelto esencial en el caso de una pandemia. Una vacuna contra la gripe de subunidad adyuvantada con el adyuvante MF59 en forma de una emulsión de aceite en agua está comercialmente disponible para los ancianos y la población en riesgo, y ha demostrado su capacidad para inducir un mayor título de anticuerpos que el obtenido con la vacuna de subunidad no adyuvantada (De Donato y col. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101). Sin embargo, en una publicación posterior, la misma vacuna no ha demostrado su perfil mejorado en comparación con una vacuna fraccionada no adyuvantada (Puig-Barbera y col., 2004, Vaccine 23, 283-289). El documento WO2006/100110 informa de composiciones contra la gripe adyuvantadas con AS03 para su uso en gripe estacional y pandémica.

Por tanto, todavía son una necesidad nuevas vacunas que sean eficaces mientras que tratan las consideraciones de ahorro de antígeno. Estas nuevas vacunas tendrán una inmunogenicidad aceptable, si no mejorada, en particular contra cepas pandémicas débilmente o no inmunogénicas o para individuos inmunodeprimidos tales como la población anciana. Estas nuevas vacunas tendrán idealmente un potencial de protección cruzada, de forma que podrían usarse como vacunas prepandémicas o de reserva para sensibilizar una población que no ha sido tratada previamente inmunológicamente contra una cepa pandémica antes o tras la declaración de una pandemia.

Exposición de la invención

Los presentes inventores han descubierto que, con el fin de mejorar el suministro de vacunas contra la gripe, podrían desarrollarse novedosas formulaciones contra la gripe inmunogénicas eficaces que contienen un adyuvante, permitiéndose así que se use una menor cantidad del antígeno de la gripe. Por este documento se proporcionan composiciones adyuvantadas novedosas que permiten que una formulación de ahorro de antígeno proporcione suficiente protección de todos los grupos de edad, en términos de respuesta inmunitaria mediada por célula y/o respuesta humoral.

Los inventores han descubierto en particular que podría basarse en composiciones contra la gripe inmunogénicas caracterizadas porque cada uno o todos los componentes individuales del adyuvante dentro de la composición inmunogénica están a un menor nivel que el previamente pensado como útil. Esto lleva la ventaja de mantener el nivel de inmunogenicidad contra un antígeno mientras se reduce la reactividad dentro del receptor huésped.

Por consiguiente, en el primer aspecto de la presente invención se proporciona una composición contra la gripe inmunogénica, en particular una vacuna, en un volumen de dosis adecuado para uso humano que comprende un antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en la que dicho adyuvante de emulsión de aceite en agua se selecciona del grupo que consiste en:

- i) un adyuvante que consiste en 5-6 mg de escualeno, 2-3 mg de agente emulsionante, 5-7 mg de tocol por dosis humana
- ii) un adyuvante que consiste en 2-3 mg de escualeno, 1-1,5 mg de agente emulsionante, 2,5-3,5 mg de tocol por dosis humana
- iii) un adyuvante que consiste en 0,5-1,5 mg de escualeno, 0,25-0,75 mg de agente emulsionante, 0,5-1,5 mg de tocol por dosis humana

Otros aspectos de la invención se enumeran en las reivindicaciones adjuntas.

También se proporciona un kit de vacuna que comprende un componente de antígeno del virus de la gripe o un componente de preparación antigénica del virus de la gripe, opcionalmente un componente de antígeno de baja cantidad, y que comprende además para la administración concomitante o secuencial un adyuvante como se define en este documento.

También se proporciona un procedimiento para la producción de una composición inmunogénica contra la gripe para una situación pandémica, una situación prepandémica o una situación interpandémica (estacional), procedimiento que comprende mezclar un antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo con un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en este documento. En particular se proporciona un procedimiento para la producción de una vacuna contra la gripe, procedimiento que comprende una etapa de mezclar la inmunogénica adyuvantada con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y proporcionar unidades de vacunas que contienen no más de 15 µg de antígeno de hemaglutinina de la gripe por dosis. El virus de la gripe puede derivarse de huevo, derivarse de planta, derivarse de cultivo celular, o puede producirse recombinantemente. Adecuadamente, el antígeno del virus de la gripe se deriva de huevo o se deriva de cultivo celular.

También se proporciona una composición inmunogénica o una vacuna como se define en este documento para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad producida por infección de la gripe. En un aspecto relacionado se proporciona el uso de un antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y una emulsión de aceite en agua como se define en este documento en la preparación de una composición inmunogénica. Por ejemplo, una vacuna, para la protección contra la infección o enfermedad producida por un virus de la gripe.

También se proporciona el uso de (a) una baja cantidad, como se define en este documento, de antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo de cepa de la gripe, y (b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en este documento, en la preparación de una composición inmunogénica, o un kit, para inducir

al menos uno de i) una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 mejorada, ii) una respuesta de linfocitos B de memoria mejorada, iii) una respuesta humoral mejorada contra dicho antígeno del virus o composición antigénica en un ser humano, en comparación con la respuesta obtenida con la composición no adyuvantada.

5 Adicionalmente se desvela un procedimiento o uso como se define anteriormente en este documento para la protección contra infección o enfermedad producida por un virus de la gripe que es una variante del virus del que se deriva el antígeno en la composición inmunogénica. Adicionalmente se desvela un procedimiento o uso como se define anteriormente en este documento para la protección contra infecciones de la gripe o enfermedad producida por un patógeno que comprende un antígeno que es una variante de ese antígeno en la composición inmunogénica.

10 También se desvela un procedimiento de vacunación que comprende administrar un antígeno y un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en este documento.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen adicionalmente en la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **Figura 1:** Ensayo clínico: Títulos medios geométricos (GMT) para anticuerpo anti-HA en diferentes momentos de tiempo (cohorte de ATP para inmunogenicidad).

Figura 2: Ensayo clínico: Tasa de seroprotección (SPR) para título de anticuerpos de HI con intervalo de confianza del 95% en el día 0 y día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad).

20 **Figura 3:** Ensayo clínico: Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpos de HI con intervalo de confianza del 95% en el día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad).

Figura 4: Ensayo clínico: Factor de seroconversión (SCF) para título de anticuerpos de HI con intervalo de confianza del 95% en el día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad).

25 **Figura 5:** Estudio en ratones: Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c sensibilizados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis de AS03). Figura 5A: títulos de HI para anti-A/Nueva Caledonia/20/99; Figura 5B: títulos de HI para anti-A/Panamá/2007/99. Figura 5C: títulos de HI para anti-B/Shandong/7/97.

Figura 6: Estudio en ratones: Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57BI/6 sensibilizados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis de AS03).

Figura 7: Estudio en ratones: Respuesta inmunitaria celular (linfocito T CD4+) en PBMC de ratones C57BI/6 sensibilizados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis de AS03).

30 **Figura 8:** Estudio en ratones: Respuesta inmunitaria celular (linfocito T CD4+) en PBMC de ratones C57BI/6 sensibilizados con cepas heterosubtípicas e inmunizados con antígeno de dosis baja (0,5 µg) adyuvantado con intervalo de dosis de AS03.

35 **Figura 9:** Estudio en ratones: Títulos por ELISA de Ig en suero específica de H5N1 (A y B) y respuestas isotípicas de IgG1 (C y D) y IgG2b (E y F) contra H5N1 en el día 14 después de la inmunización (GMT +/-IC95) para dos dosis de antígeno diferentes: 1,5 µg (A, C y E) o 0,38 µg (B, D y F)

Figura 10: Estudio en ratones: Prueba de inhibición de la hemaglutinación (GMT +/- IC95) en el día 21 después de la inmunización (GMT +/- IC95) para dos dosis de antígeno diferentes: 1,5 µg (A) o 0,38 µg (B).

40 **Figura 11:** Estudio en ratones: Respuesta inmunitaria celular (linfocito T CD4+) en ratones C57BI/6 sin tratamiento previo inmunizados con diferentes dosis de vacuna contra H5N1 (1,5 ó 0,38 µg) adyuvantada con intervalo de dosis de AS03: (A) 1,5 µg de Ag (antígeno) de HA o (B) 0,38 µg de Ag de HA (antígeno).

Figura 12: Estudio en cerdos: Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en cerdos sensibilizados con cepas homólogas (intervalo de dosis de AS03).

Figura 13: Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57BI/6 sin tratamiento previo inmunizados con TIV o QIV simple o adyuvantada con AS03 o AS03/2.

45 **Figura 14:** Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57BI/6 sensibilizados con un virus similar a B/Victoria e inmunizados con TIV o QIV simple o adyuvantada con AS03 o AS03/2.

Figura 15: Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante): GMT para título de anticuerpos de HI en d0 y d21

50 **Figura 16:** Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en adultos): Tasas de seroprotección (SPR) para título de anticuerpos de HI en D0 y D21.

Figura 17: Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en adultos): Fig. 17A: Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA 21); Fig. 17B: por categoría de edad.

Figura 18: Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en adultos): Fig. 18A: Factor de seroconversión (SCF) para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA 21); Fig. 18B: por categoría de edad.

55 **Figura 19:** Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en ancianos): GMT para título de anticuerpos de HI en d0 y d21.

Figura 20: Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en ancianos): Tasas de seroprotección (SPR) para título de anticuerpos de HI con intervalo de confianza del 95% en los días 0 y 21.

60 **Figura 21:** Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en ancianos): Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA 21).

Figura 22: Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en ancianos): SCF para título de anticuerpos de HI con IC del 95% en el día 21 (cohorte de ATP para HI por inmunogenicidad)

Figura 23: Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en ancianos): Linfocitos T CD4 positivos para citocinas para cepas reunidas en D0 y D21 (cohorte de ATP para CMI).

Figura 24: Ensayo clínico humano (intervalo de dosis de adyuvante en ancianos): Porcentaje de sujetos que informan síntomas esperados e inesperados relacionados (todos los grados / grado 3) durante el periodo de 7 días (Días 0-6) después de la vacunación (cohorte vacunada total).

Descripción detallada

Los presentes inventores han descubierto que ciertas composiciones de adyuvante que comprenden un aceite metabolizable, un agente emulsionante y un tocol y/o un esteroide, en las que cada componente está presente a un menor nivel para dosis de vacuna humana que el usado antes, pueden mejorar respuestas inmunitarias a una preparación contra la gripe, mientras que al mismo tiempo tienen menor reactogenicidad que algunas formulaciones de la técnica anterior en las que los componentes de adyuvante estaban presentes a mayores niveles (adecuadamente 2 veces mayores o más) por dosis humana.

Los presentes inventores han encontrado adicionalmente que una formulación de la gripe que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo junto con un adyuvante como se define en este documento, y opcionalmente adicionalmente con inmunostimulantes tales como con un derivado de lípido A tal como 3D-MPL, pudo i) mejorar la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 y/o la respuesta inmunitaria humoral contra dicho antígeno o composición antigénica en comparación con la obtenida con el virus sin adyuvante o preparación antigénica del mismo, y/o ii) generar una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 y/o respuesta inmunitaria humoral contra dicho antígeno o composición antigénica comparable a la obtenida con la composición adyuvantada con un adyuvante en la que cada componente está presente a un mayor nivel (adecuadamente 2 veces mayor o más). Las formulaciones adyuvantadas con el adyuvante se usan ventajosamente para inducir respuestas de linfocitos T CD4 contra la gripe que pueden detectar epítopes de la gripe presentados por moléculas del MHC de clase II. El presente solicitante ha encontrado que es eficaz elegir como diana el sistema inmunitario mediado por célula con el fin de aumentar la receptividad contra cepas de la gripe homólogas y de desviación (tras la vacunación e infección).

Es una realización específica de la presente invención que las composiciones para su uso en la presente invención puedan proporcionar en seres humanos cualquiera o ambos de (i) una mejor seroprotección contra la gripe tras la revacunación en comparación con la composición sin adyuvante, y (ii) una seroprotección comparable contra la gripe tras la revacunación en comparación con una composición adyuvantada en la que cada componente está presente a un mayor nivel, como se evalúa por el número de sujetos humanos que cumplen cualquiera, varios o todos los correlatos de la gripe de protección (es decir, tasa de seroconversión, factor de conversión, tasa de protección). Además, es otra realización específica que la composición para su uso en la presente invención también podrá inducir cualquiera o ambos de (i) una mayor respuesta de linfocitos B de memoria tras la primera vacunación de un sujeto humano, y una mayor respuesta humoral tras la revacunación, en comparación con la composición no adyuvantada, y (ii) una respuesta de linfocitos B de memoria comparable tras la primera vacunación de un sujeto humano, y una respuesta humoral comparable tras la revacunación, en comparación con la composición adyuvantada en la que cada componente está presente a un mayor nivel (adecuadamente 2 veces mayor o más).

Las composiciones contra la gripe adyuvantadas según la invención tienen varias ventajas. Estas ventajas pueden evaluarse por comparación con las composiciones adyuvantadas no equivalentes, o por comparación con la composición adyuvantada en la que cada componente de adyuvante está presente a un mayor nivel:

- 1) una inmunogenicidad mejorada en comparación con la composición no adyuvantada, permitiéndose así cualquiera o todas de las siguientes: i) mejorar la respuesta inmunitaria débil a cepas de la gripe menos inmunogénicas a un nivel superior al obtenido con las formulaciones no adyuvantadas; ii) restaurar la respuesta inmunitaria débil en poblaciones específicas tales como en las personas mayores (más de 50 años, normalmente más de 65 años) a niveles observados en personas jóvenes (respuestas de anticuerpos y/o linfocitos T);
- 2) el uso de adyuvantes puede reducir la posible inmunogenicidad débil del antígeno en una población sin tratamiento previo o en lactantes jóvenes (entre 6 meses y 4 años, en particular niños de menos de 1 año) e inducir sensibilización y protección;
- 3) además de proporcionar una protección al menos equivalente contra las cepas de vacuna con respecto a una vacuna clásica (por ejemplo, una vacuna fraccionada comercialmente disponible), pueden conferir una capa de protección adicional contra cepas de desviación conduciendo a un perfil de protección cruzada mejorado: aumento de la reactividad cruzada, protección cruzada contra cepas de la gripe variantes (desviadas), permitiendo la fijación de una estrategia de sensibilización cruzada; esto es de especial interés cuando puedan usarse como vacunas pre-pandémicas permitiendo adicionalmente sólo una dosis de una vacuna pandémica que va a requerirse para potenciar la protección contra la cepa pandémica (en circulación); esto también es de interés ya que puede tratar el problema de desviaciones de H3N2 que tienden a aparecer más rápidamente que en la otra cepa A inter-pandémica H1N1;
- 4) un perfil de reactogenicidad reducido de la composición adyuvantada en comparación con el perfil obtenido con una composición en la que cada componente está presente a un mayor nivel (adecuadamente 2 veces mayor o más), mientras que se mantiene un potencial inmunogénico satisfactorio.

Alcanzando adicionalmente cualquiera o todas de estas ventajas con una dosificación de antígeno reducida (normalmente inferior a 15 µg/cepa/dosis) y una dosificación de adyuvante reducida se garantizará un aumento de la capacidad en caso de emergencia o para la preparación de una situación pandémica (ahorro de antígeno en la situación pandémica) y ofreciendo una posibilidad de mayor número de dosis de vacuna disponibles para la población durante la estación de vacunación interpandémica.

Basándose en una combinación de una dosificación de antígeno reducida y/o una dosificación de adyuvante reducida permitirán el desarrollo de composiciones contra la gripe más complejas, tales como una vacuna cuadrivalente, que comprende una cuarta cepa que puede ser una segunda cepa de la gripe B o una cepa de la gripe pandémica que va a añadirse a la vacuna trivalente convencional.

En otro aspecto de la invención, la composición inmunogénica adyuvantada como se define en este documento demuestra resultados de inmunogenicidad para tanto la producción de anticuerpos como la frecuencia después de la vacunación de CD4 específicos de la gripe (opcionalmente con reactividad cruzada) que son superiores o equivalentes a aquellos generados con vacuna no adyuvantada o con la vacuna adyuvantada con un adyuvante en el que los componentes de adyuvante están presentes a un mayor nivel, respectivamente. Este efecto es en particular de valor en la población pediátrica o la población anciana permitiendo mayor eficacia que las vacunas actualmente comerciales, mientras que muestran síntomas de reatogenicidad menores o más bajos en comparación con el grupo que recibe la vacuna adyuvantada en la que los componentes de adyuvante están a una mayor cantidad (adecuadamente 2 veces mayor).

Adyuvantes de emulsión de aceite en agua

Entre los adyuvantes conocidos en la técnica se encuentran las emulsiones de aceite en agua, que pueden comprender opcionalmente otros inmunoestimulantes. La fase aceitosa de un sistema de emulsión tal comprende un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es muy conocido en la técnica. Metabolizable puede definirse como que puede ser transformado por el metabolismo (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o sintético, que no sea tóxico para el receptor y pueda ser transformado por el metabolismo. Frutos secos, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de la presente invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es el escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en menores cantidades en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levadura, y es un aceite para su uso en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un producto intermedio en la biosíntesis del colesterol (Merck index, 10ª edición, entrada nº 8619).

Las emulsiones de aceite en agua son por sí muy conocidas en la técnica, y se ha sugerido que son útiles como composiciones de adyuvante (documento EP399843B); también las combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos se han descrito como adyuvantes para vacunas: documentos WO95/17210; WO99/56414; WO99/12565; WO99/11241; WO2006/100109; WO 2006/100110; WO 2006/100111 que desvelan adyuvantes de emulsión basados en escualeno, α-tocoferol y TWEEN 80, opcionalmente formulados con los inmunoestimulantes QS21 y/o 30-MPL. Se han descrito otros adyuvantes basados en emulsión de aceite en agua tales como los desvelados en los documentos WO90/14837; WO00/50006; WO2007/080308; WO2007/006939, formando todos sistemas de emulsión de aceite (en particular cuando se basan en escualeno) para formar adyuvantes y composiciones alternativas.

Los tocoles (por ejemplo, la vitamina E) también se usan frecuentemente en adyuvantes de emulsión de aceite (documentos EP0382271B1; US5667784; WO95/17210). Los tocoles usados en las emulsiones de aceite (opcionalmente emulsiones de aceite en agua) de la invención pueden formularse como se describe en el documento EP038227181, en el que los tocoles pueden ser dispersiones de gotitas de tocol, que opcionalmente comprenden una emulsionante, de opcionalmente menos de 1 micrómetro de diámetro. Alternativamente, los tocoles pueden usarse en combinación con otro aceite para formar la fase aceitosa de una emulsión de aceite. Ejemplos de emulsiones de aceite que pueden usarse en combinación con el tocol se describen en este documento, tales como los aceites metabolizables descritos anteriormente.

El procedimiento de producir emulsiones de aceite en agua es muy conocido para el experto en la materia. Comúnmente, el procedimiento comprende mezclar la fase aceitosa con un tensioactivo tal como una disolución de PBS/TWEEN80™, seguido de la homogeneización usando un homogeneizador, sería evidente para un experto en la materia que un procedimiento que comprende pasar la mezcla dos veces por una aguja de jeringuilla sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el procedimiento de emulsión en microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a la entrada de presión máxima de 6 bar (0,6 MPa) (presión de salida de aproximadamente 850 bar (8,5 MPa))) podría ser adaptado por el experto en la materia para producir volúmenes más pequeños o más grandes de emulsión. La adaptación podría lograrse por experimentación rutinaria que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se logre una preparación con gotitas de aceite del diámetro requerido.

En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsionante deberían estar en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

5 El tamaño de las gotitas de aceite encontradas dentro de la emulsión de aceite en agua estable es opcionalmente inferior a 1 micrómetro, puede estar en el intervalo de sustancialmente 30-600 nm, opcionalmente sustancialmente aproximadamente 30-500 nm de diámetro, y opcionalmente sustancialmente 150-500 nm de diámetro, y en particular aproximadamente 150 nm de diámetro como se mide por espectroscopía de correlación de fotones. A este respecto, el 80% de las gotitas de aceite por número debería estar dentro de los intervalos, opcionalmente más del 90% y opcionalmente más del 95% de las gotitas de aceite por número están dentro de los intervalos de tamaño definidos.

10 El adyuvante de la invención

El adyuvante de la invención es una emulsión de aceite en agua que comprende:

- como aceite metabolizable no tóxico, escualeno;
- un tocol tal como tocoferol, y en particular alfa-tocoferol;
- un emulsionante (o tensioactivo) tal como el tensioactivo no iónico TWEEN 80™ o polisorbato 80.

15 Opcionalmente, la emulsión de aceite comprende además un esteroles tal como colesterol.

20 Un aspecto clave de la presente invención es el hecho de que los componentes presentes en el adyuvante de las composiciones inmunogénicas estén a cantidades menores a las que previamente se habían creído útiles, adecuadamente a menos de 11 mg de aceite metabolizable (tal como escualeno), por ejemplo, entre 0,5-11 mg, 0,5-10 mg o 0,5-9 mg, y a menos de 5 mg de agente emulsionante (adecuadamente tal como monooleato de polioxietilensorbitano), por ejemplo, entre 0,1-5 mg, por dosis humana de la composición inmunogénica. Adecuadamente, el tocol (por ejemplo, alfa-tocoferol), si está presente, está a menos de 12 mg, por ejemplo, entre 0,5-12 mg. La composición de adyuvante de la invención es una emulsión de aceite en agua seleccionada del grupo que consiste en:

- 25
- i) un adyuvante que consiste en 5-6 mg de escualeno, 2-3 mg de agente emulsionante y 5-7 mg de tocol por dosis humana;
 - ii) un adyuvante que consiste en 2-3 mg de escualeno, 1-1,5 mg de agente emulsionante y 2,5-3,5 mg de tocol por dosis humana;
 - iii) un adyuvante que consiste en 0,5-1,5 mg de escualeno, 0,25-0,75 mg de agente emulsionante y 0,5-1,5 mg de tocol por dosis humana.

30 En algunos casos puede ser ventajoso que las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizador, por ejemplo, otros emulsionantes/tensioactivos, que incluyen ácido caprílico (Merck index, 10ª edición, entrada nº 1739), por ejemplo, tricaprilina.

Adecuadamente, dicha emulsión tiene gotitas de aceite de las que al menos el 70%, adecuadamente al menos el 80% por intensidad tienen diámetros inferiores a 1 micrómetro.

35 Se proporciona adicionalmente una dosis humana de una composición inmunogénica y un adyuvante de la invención.

40 Por el término "dosis humana" se indica una dosis de composición contra la gripe (después de mezclar los componentes de adyuvante y de antígeno) que se administra en un volumen adecuado para uso humano. Generalmente, ésta es entre 0,25 y 1,5 ml. En una realización, una dosis humana es aproximadamente 0,5 ml. En otra realización, una dosis humana es superior a 0,5 ml, por ejemplo, aproximadamente 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o aproximadamente 1 ml. En otra realización, una dosis humana está entre 1 ml y 1,5 ml. En otra realización, en particular cuando la composición inmunogénica es para la población pediátrica, una dosis humana puede ser inferior a 0,5 ml, por ejemplo, entre 0,25 y 0,5 ml o exactamente 0,1 ml, 0,2 ml, 0,25 ml, 0,3 ml o 0,4 ml. La invención se caracteriza porque cada uno o todos los componentes individuales del adyuvante dentro de la composición

45 inmunogénica están a un menor nivel que el que previamente se creía útil y normalmente están como se ha enumerado anteriormente. Composiciones particularmente adecuadas comprenden los siguientes componentes de adyuvante de o/w en las siguientes cantidades en el volumen final de dosis humana (adecuadamente de aproximadamente 0,5 ml o aproximadamente 0,7 ml) (Tabla 1):

Tabla 1A - Adyuvantes basados en emulsión o/w específicos según la invención

| | Adyuvante A | Adyuvante B | Adyuvante E | Adyuvante F | Adyuvante C | Adyuvante H | Adyuvante G | Adyuvante D |
|---|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| Emulsión o/w* | 125 µl | 100 µl | 83,33 µl | 62,5 µl | 50 µl | 41,67 µl | 31,25 µl | 25 µl |
| Componentes: | | | | | | | | |
| Tocoferol (mg) | 5,94 (5,6-6,2) | 4,75 (4,5-5,0) | 3,96 (3,8-4,2) | 2,97 (2,8-3,1) | 2,38 (2,3-2,5) | 1,98 (1,9-2,1) | 1,49 (1,4-1,6) | 1,19 (1,1-1,25) |
| Escualeno (mg) | 5,35 (5,1-5,6) | 4,28 (4,1-4,5) | 3,57 (3,4-3,75) | 2,68 (2,5-2,8) | 2,14 (2,0-2,25) | 1,78 (1,7-1,9) | 1,34 (1,3-1,4) | 1,07 (1,0-1,1) |
| Polisorbato 80 o Tween 80 (mg) | 2,43 (2,3-2,6) | 1,94 (1,8-2,0) | 1,62 (1,5-1,7) | 1,21 (1,1-1,3) | 0,97 (0,9-1,0) | 0,81 (0,8-0,9) | 0,61 (0,58-0,64) | 0,49 (0,47-0,51) |
| * se facilitan volúmenes de o/w adecuados para ilustración, pero no son limitantes () entre paréntesis están intervalos adecuados (+/- 5%) alrededor del valor anterior | | | | | | | | |

Tabla 1B - Adyuvantes basados en emulsión o/w específicos según la invención

| | Adyuvante I | Adyuvante J | Adyuvante K | Adyuvante L | Adyuvante M | Adyuvante N | Adyuvante O | Adyuvante P |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Componentes: | | | | | | | | |
| Span 85 (mg) | 0,59 (0,56-0,62) | 0,47 (0,45-0,49) | 0,39 (0,37-0,41) | 0,29 (0,28-0,3) | 0,24 (0,23-0,25) | 0,2 (0,19-0,21) | 0,15 (0,14-0,16) | 0,12 (0,11-0,13) |
| Escualeno (mg) | 4,88 (4,6-5,1) | 3,9 (3,7-4,1) | 3,25 (3,1-3,4) | 2,44 (2,3-2,6) | 1,95 (1,85-2,05) | 1,63 (1,55-1,7) | 1,22 (1,2-1,3) | 0,98 (0,9-1,1) |
| Polisorbato 80 o Tween 80 (mg) | 0,59 (0,56-0,62) | 0,47 (0,45-0,49) | 0,39 (0,37-0,41) | 0,29 (0,28-0,3) | 0,24 (0,23-0,25) | 0,2 (0,19-0,21) | 0,15 (0,14-0,16) | 0,12 (0,11-0,13) |

| | Adyuvante Q | Adyuvante R | Adyuvante S | Adyuvante T | Adyuvante U | Adyuvante V | Adyuvante W | Adyuvante X |
|--|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Componentes: | | | | | | | | |
| Span 85 (mg) | 0,84 (0,8-0,9) | 0,67 (0,64-0,7) | 0,56 (0,53-0,6) | 0,42 (0,4-0,44) | 0,34 (0,32-0,36) | 0,28 (0,27-0,3) | 0,21 (0,2-0,22) | 0,17 (0,16-0,18) |
| Escualeno (mg) | 4,88 (4,6-5,1) | 3,9 (3,7-4,1) | 3,25 (3,1-3,4) | 2,44 (2,3-2,6) | 1,95 (1,85-2,05) | 1,63 (1,55-1,7) | 1,22 (1,2-1,3) | 0,98 (0,9-1,1) |
| Polisorbato 80 o Tween 80 (mg) | 0,84 (0,8-0,9) | 0,67 (0,64-0,7) | 0,56 (0,53-0,6) | 0,42 (0,4-0,44) | 0,34 (0,32-0,36) | 0,28 (0,27-0,3) | 0,21 (0,2-0,22) | 0,17 (0,16-0,18) |
| () entre paréntesis están intervalos adecuados (+/- 5%) alrededor del valor anterior (+/- 5%) | | | | | | | | |

5 Todos los valores numéricos facilitados (por ejemplo, en % o en mg), incluyendo aquellos en la Tabla 1, deberían entenderse que permiten un 5% de variación, es decir, 4,88 mg de escualeno debería entenderse que significa entre 4,64-5,12 mg.

Puede realizarse una predilución de cada componente (emulsión o/w y antígeno) para producir una vacuna adyuvantada que administra la cantidad de HA requerida y la cantidad de componente de adyuvante requerida.

10 La emulsión o/w de la vacuna adyuvantada (tanto prediluida como no) puede añadirse a un volumen que no supera, o adecuadamente inferior a, la mitad del volumen de dosis total. A modo de ilustración se facilitan volúmenes adecuados (por ejemplo, que oscilan de 125 µl a 25 µl) para el componente de emulsión de las formulaciones A-H ilustradas en la Tabla 1A. Por consiguiente, se proporciona un procedimiento para preparar una vacuna contra la gripe adyuvantada que comprende una etapa de mezclar un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, en el que el segundo volumen es mayor que el primer volumen. Adecuadamente, el primer volumen de emulsión o/w se obtiene después de la dilución de una emulsión concentrada.

15 Alternativamente, volúmenes sustancialmente iguales (tanto después de la predilución como no) de la emulsión o/w y la suspensión de antígeno se mezclan para producir las composiciones de vacuna adyuvantada de la invención. Entonces, el volumen respectivo de cada componente estará normalmente a un exceso máximo del 10% del otro componente (es decir, relación de emulsión de adyuvante:suspensión de antígeno de 1:1,1 a 1,1:1), adecuadamente a un exceso máximo del 5% (es decir, relación de emulsión o/w:suspensión de antígeno de 1:1,05 a 1,05:1), adecuadamente a un exceso máximo del 2,5% (es decir, relación de emulsión de adyuvante:suspensión de antígeno de 1:1,025 a 1,025:1). Por consiguiente, en otro aspecto se proporciona un procedimiento para preparar una vacuna contra la gripe adyuvantada que comprende una etapa de mezclar volúmenes sustancialmente iguales de una emulsión de aceite en agua y de una suspensión acuosa que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo. Adecuadamente, el primer volumen de emulsión o/w se obtiene después de la dilución de una emulsión concentrada.

5 Todavía en otra realización, el adyuvante de emulsión o/w de la vacuna adyuvantada de la invención se añade a un volumen que supera la mitad del volumen de dosis total. Por consiguiente, en otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para preparar una vacuna contra la gripe adyuvantada que comprende una etapa de mezclar un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, en el que el primer volumen es mayor que el segundo volumen. Adecuadamente, el primer volumen de emulsión o/w se obtiene después de la dilución de una emulsión concentrada.

10 En los tres procedimientos, las cantidades de componentes de emulsión y opcionalmente HA en el volumen de dosis humano final son inferiores a las que se creía previamente útiles y son como se reivindican. Adecuadamente, están en las cantidades específicas que se reivindican en este documento.

La cantidad de cada componente individual dentro de la vacuna puede expresarse como un porcentaje de la composición de vacuna total, es decir, en % (volumen/volumen) o en % (peso/volumen). Las siguientes cifras de conversión serán conocidas por el experto y pueden aplicarse: escualeno 0,855 g/ml, alfa-tocoferol 0,949 g/ml, polisorbato 80 1,080 g/ml y Span 85 0,94 g/ml.

15 Las cifras de conversión se calcularán basándose en que un volumen de dosis de vacuna puede ser, en realizaciones específicas, 0,5 ml o 0,7 ml.

20 La invención proporciona además una composición de adyuvante que comprende los componentes individuales como se definen en este documento anteriormente y en la cantidad definida anteriormente, por ejemplo, pero no exclusivamente como se ilustra en la Tabla 1. Normalmente, una composición de adyuvante tal estará en un volumen adecuado de dosis humana. Si el adyuvante está en una forma líquida que va a combinarse con una forma líquida de una composición antigénica, la composición de adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis humana que es una fracción del volumen final previsto de la dosis humana tal como, por ejemplo, aproximadamente la mitad del volumen final previsto de la dosis humana, por ejemplo, un volumen de 360 µl para una dosis humana prevista de 0,7 ml, o un volumen de 250 µl para una dosis humana prevista de 0,5 ml. Si la dosis de vacuna humana se aumenta se pretende que la cantidad (en mg) de los componentes de adyuvante permanezcan invariables por este aumento del volumen de dosis, estando simplemente más diluidos. La composición de adyuvante se diluye según se necesite cuando se combina con la composición de antígeno para proporcionar la dosis humana final de vacuna. El volumen final de tal dosis variará por supuesto dependiendo del volumen inicial de la composición de adyuvante y el volumen de composición de antígeno añadido a la composición de adyuvante.

30 En una realización alternativa se usa adyuvante líquido para reconstituir una composición de antígeno liofilizada. En esta realización, el volumen adecuado de dosis humana de la composición de adyuvante es aproximadamente igual al volumen final de la dosis humana. La composición de adyuvante líquido se añade al vial que contiene la composición de antígeno liofilizado. La dosis humana final puede variar entre 0,5 y 1,5 ml. En una realización particular, la dosis humana es aproximadamente 0,5 ml o aproximadamente 0,7 ml, en esta realización la composición de vacuna comprenderá menos de 11 mg de aceite metabolizable, 5 mg de agente emulsionante y 23 mg de tocol por dosis humana, y específicamente en las cantidades especificadas anteriormente y reivindicadas. La concentración exacta de los componentes de adyuvante depende de si la composición de adyuvante pretende combinarse con una composición de antígeno líquido o liofilizado.

40 Opcionalmente, la relación de aceite (por ejemplo, escualeno):tocol (por ejemplo, α -tocoferol) es igual o inferior a 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable.

En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas contengan adicionalmente un estabilizador.

45 La dosis de los componentes a la que opera el adyuvante en la composición inmunogénica es adecuadamente capaz de potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un ser humano. En particular, una cantidad adecuada de aceite metabolizable, tocol y monooleato de polioxietilensorbitano es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición no adyuvantada, o es la que da un potencial inmunológico similar al obtenido con la composición adyuvantada con un adyuvante que comprende otra cantidad - mayor - de dichos componentes, en una población humana diana, mientras que sea aceptable desde un perfil de reactogenicidad.

Inmunoestimulantes opcionales

50 En una realización específica según la invención, el adyuvante no contiene ningún inmunoestimulante adicional, en particular no contiene un derivado de lípido A no tóxico (tal como 3D-MPL) o una saponina (tal como QS21).

En otra realización se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante de la invención y opcionalmente uno o más inmunoestimulantes adicionales.

55 En una realización específica, el adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende opcionalmente uno o más adyuvantes o inmunoestimulantes adicionales distintos de QS21 y/o MPL.

En otra realización específica, el adyuvante de emulsión de aceite en agua y la composición inmunogénica comprenden además un inmunoestimulante adicional que es un lipopolisacárido, adecuadamente un derivado de lípido A no tóxico, particularmente monofosforil lípido A, o más particularmente monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MPL). 3D-MPL se comercializa bajo el nombre MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y se denomina en todo el documento MPL o 3D-MPL. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094. 3D-MPL promueve principalmente respuestas de linfocitos T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). 3D-MPL puede producirse según los procedimientos desvelados en el documento GB2220211 A. Químicamente, es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención puede usarse 3D-MPL de partículas pequeñas. El 3D-MPL de partículas pequeñas tiene un tamaño de partícula de forma que pueda esterilizarse por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en el documento WO94/21292.

Dicho lipopolisacárido, tal como 3D-MPL, puede usarse en cantidades entre 1 y 50 µg por dosis humana de la composición inmunogénica. Tal 3D-MPL puede usarse a un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo, entre 20 - 30 µg, adecuadamente entre 21 - 29 µg o entre 22 y 28 µg o entre 23 y 27 µg o entre 24 y 26 µg, o 25 µg. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo, entre 5 y 15 µg, adecuadamente entre 6 y 14 µg, por ejemplo, entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg, o 10 µg. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo, entre 1 y 9 µg, o entre 2 y 8 µg, o adecuadamente entre 3 y 7 µg o 4 y 6 µg, o 5 µg.

En otra realización se usan derivados de lípido A sintéticos como inmunoestimulante adicional opcional, describiéndose algunos como agonistas de TLR-4 e incluyen, pero no se limitan a:

OM174 (dihidrogenofosfato de 2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosilo) (documento WO 95/14026)

OM 294 DP 1,10-bis(dihidrogenofosfato) de (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decano-1,10-diol (documentos WO99/64301 y WO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP 1-dihidrogenofosfato-10-(6-aminohexanoato) de (3S,-9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decano-1,10-diol (documento WO 01/46127)

Otros ligandos TLR4 que pueden usarse son fosfatos de alquilglucosaminida (AGP) tales como los desvelados en los documentos WO9850399 o US6303347 (también se desvelan procedimientos para la preparación de AGP), adecuadamente RC527 o RC529, o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se han desvelado en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes.

Otros ligandos TLR4 adecuados que pueden producir una respuesta de señalización por TLR-4 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5) son, por ejemplo, lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado de LPS no tóxico (tal como 3D-MPL). Otros agonistas de TLR adecuados son: proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 ó 90; proteína A de tensoactivo, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparano, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensina 2, muramildipéptido (MDP) o proteína F del virus respiratorio sincitial. En una realización, el agonista de TLR es HSP 60, 70 ó 90. Otros ligandos TLR-4 adecuados son como se describen en el documento WO 2003/011223 y en el documento WO 2003/099195 tales como el compuesto I, compuesto II y compuesto III desvelados en las páginas 4-5 del documento WO2003/011223 o en las páginas 3-4 del documento WO2003/099195, y en particular aquellos compuestos desvelados en el documento WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 y ER804764. Adecuadamente, dicho ligando TLR-4 es ER804057.

Los receptores similares a Toll (TLR) son receptores transmembrana de tipo I, evolutivamente conservados entre insectos y seres humanos. Hasta la fecha se han establecido diez TLR (TLR 1-10) (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Los miembros de la familia de los TLR tienen dominios extracelulares e intracelulares similares; se ha mostrado que sus dominios extracelulares tienen secuencias de repetición ricas en leucina, y sus dominios intracelulares son similares a la región intracelular del receptor de la interleucina 1 (IL-1R). Las células de TLR se expresan de forma diferente entre células inmunitarias y otras células (incluyendo células epiteliales vasculares, adipocitos, miocitos cardíacos y células epiteliales intestinales). El dominio intracelular de los TLR puede interactuar con la proteína adaptadora Myd88, que también lleva el dominio de IL-1R en su región citoplásmica, conduciendo a la activación de NF-KB de citocinas; esta ruta de Myd88 es una ruta por la que la liberación de citocinas se efectúa por la activación de TLR. La expresión principal de TLR es en tipos de células tales como células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, etc.).

La activación de células dendríticas por estimulación mediante los TLR conduce a la maduración de células

dendríticas, y a la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-12. La investigación llevada a cabo hasta la fecha ha encontrado que los TLR reconocen diferentes tipos de agonistas, aunque algunos agonistas son comunes a varios TLR. Los agonistas de TLR se derivan predominantemente de bacterias o virus, e incluyen moléculas tales como flagelina o lipopolisacárido bacteriano (LPS). Por "agonista de TLR" se indica un componente que puede provocar una respuesta de señalización mediante una ruta de señalización de TLR, tanto como un ligando directo como indirectamente mediante la generación de ligando endógeno o exógeno (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5).

En otra realización, otras moléculas de agonistas de TLR naturales o sintéticas se usan como inmunoestimulantes adicionales opcionales. Éstos podrían incluir, pero no se limitan a, agonistas para TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9.

Por consiguiente, en una realización, la composición de adyuvante e inmunogénica comprende además un inmunoestimulante adicional que se selecciona del grupo que consiste en: un agonista de TLR-1, un agonista de TLR-2, un agonista de TLR-3, un agonista de TLR-4, un agonista de TLR-5, un agonista de TLR-6, un agonista de TLR-7, un agonista de TLR-8, un agonista de TLR-9, o una combinación de los mismos.

En una realización se usa un agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-1 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-1 se selecciona de: lipopéptidos tri-acilados (LP); modulina soluble en fenol; LP de *Mycobacterium tuberculosis*; S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, LP de triclorhidrato (Pam₃Cys) que imita el extremo amino acetilado de una lipoproteína bacteriana y OspA LP de *Borrelia burgdorferi*.

En una realización alternativa se usa un agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-2 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-2 es uno o más de una lipoproteína, un peptidoglicano, un polipéptido bacteriano de *M. tuberculosis*, *B. burgdorferi*, *T. pallidum*; peptidoglicanos de especies que incluyen *Staphylococcus aureus*; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, porinas de *Neisseria*, fimbrias bacterianas, factores de virulencia de *Yersina*, viriones del CMV, hemaglutinina de sarampión y zimosano de levadura.

En una realización alternativa se usa un agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-3 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-3 es ARN bicatenario (ARNbc), o ácido poliinosínico-policitidílico (poli IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado a infección vírica.

En una realización alternativa se usa un agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-5 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-5 es flagelina bacteriana.

En una realización alternativa se usa un agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-6 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-6 es lipoproteína micobacteriana, LP di-acilado y modulina soluble en fenol. Otros agonistas de TLR6 se describen en el documento W02003043572.

En una realización alternativa se usa un agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-7 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-7 es un ARN monocatenario (ARNmc), loxoribina, un análogo de guanósina en las posiciones N7 y C8, o un compuesto de imidazoquinolina, o derivado del mismo. En una realización, el agonista de TLR es imiquimod. Otros agonistas de TLR7 se describen en el documento W002085905.

En una realización alternativa se usa un agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-8 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-8 es un ARN monocatenario (ARNmc), molécula de imidazoquinolina con actividad antivírica, por ejemplo, resiquimod (R848); resiquimod también puede reconocerse por TLR-7. Otros agonistas de TLR-8 que puede usarse incluyen aquellos descritos en el documento W02004071459.

En una realización alternativa se usa un agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-9 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). En una realización, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-9 es HSP90.

Alternativamente, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-9 es ADN bacteriano o vírico, ADN que contiene nucleótidos de CpG sin metilar, en particular contextos de secuencia conocidos como motivos de CpG. Los oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta de predominantemente Th1. Tales oligonucleótidos son muy conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las patentes de EE.UU. n° 6.008.200 y 5.856.462. Adecuadamente, los nucleótidos de CpG son oligonucleótidos de CpG. Oligonucleótidos adecuados para su uso en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, opcionalmente que contienen dos o más motivos de CpG de dinucleótidos separados por al menos tres, adecuadamente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo de CpG es un nucleótido citosina seguido de un nucleótido guanina. Los oligonucleótidos de

CpG de la presente invención son normalmente desoxinucleótidos. En una realización específica, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o adecuadamente un enlace fosforotioato, aunque el fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos estén dentro del alcance de la invención. Dentro del alcance de la invención también están incluidos oligonucleótidos con enlaces internucleotídicos mixtos. Los procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos US5.666.153, US5.278.302 y WO95/26204. Ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias pueden contener enlaces internucleotídicos modificados con fosforotioato.

OLIGO 1 (SEC ID N°:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
 OLIGO 2 (SEC ID N°:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
 OLIGO 3 (SEC ID N°:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
 OLIGO 4 (SEC ID N°:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006 ó 7909)
 OLIGO 5 (SEC ID N°:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
 OLIGO 6 (SEC ID N°:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

Adecuadamente se usa el esqueleto de fosforotioato CpG7909 (SEC ID N°:4). Oligonucleótidos de CpG alternativos pueden comprender las secuencias anteriormente especificadas en las que tienen deleciones sin importancia o adiciones a las mismas. Los oligonucleótidos de CpG utilizados en la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, véase el documento EP 468520). Convenientemente, tales oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automatizado.

La composición de adyuvante e inmunogénica puede comprender adicionalmente un adyuvante de saponina. Una saponina particularmente adecuada para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano *Quillaja Saponaria* Molina y fue descrito por primera vez por Dalsgaard y col. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, vol. 44, Springer Verlag, Berlín, pág. 243-254) por tener actividad de adyuvante. Los fragmentos purificados de Quil A han sido aislados por HPLC que retienen actividad de adyuvante sin la toxicidad asociada a Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo, QS7 y QS21 (también conocidas como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina que induce linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL), células Th1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención. En una forma adecuada de la presente invención, el adyuvante de saponina dentro de la composición inmunogénica es un derivado de *saponaria molina* quil A, tal como una fracción inmunológicamente activa de Quil A, tal como QS-17 o QS-21, adecuadamente QS-21. En una realización, las composiciones de la invención contienen la fracción de saponina inmunológicamente activa en forma sustancialmente pura. En una realización, las composiciones de la invención contienen QS21 en forma sustancialmente pura, es decir, QS21 tiene al menos el 90% de pureza, por ejemplo, al menos el 95% de pureza, o al menos el 98% de pureza.

Otras saponinas útiles se derivan de las plantas *Aesculus hippocastanum* o *Gyophilla struthium*. Otras saponinas que se han descrito en la bibliografía incluyen escina, que se ha descrito en the Merck index (12ª ed: entrada 3737) como una mezcla de saponinas que se producen en la semilla del árbol del castaño de Indias, Lat: *Aesculus hippocastanum*. Su aislamiento se describe por cromatografía y purificación (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), y por resinas de intercambio iónico (Erbring y col., documento US 3.238.190). Las fracciones de escina se han purificado y se ha mostrado que son biológicamente activas (Yoshikawa M, y col. (Chem Pharm Bull (Tokyo) 1996 Aug;44(8):1454-1464)). La saponina de *Gypsophila struthium* (R. Vochten y col., 1968, J. Pharm.Belg., 42, 213-226) también es una opción.

Dicha saponina inmunológicamente activa, tal como QS21, puede usarse en cantidades de entre 1 y 50 µg, por dosis humana de la composición inmunogénica. Ventajosamente, la QS21 se usa a un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo, entre 20-30 µg, adecuadamente entre 21-29 µg o entre 22-28 µg o entre 23-27 µg o entre 24-26 µg, o 25 µg. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo, entre 5 y 15 µg, adecuadamente entre 6-14 µg, por ejemplo, entre 7-13 µg o entre 8-12 µg o entre 9-11 µg, o 10 µg. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo, entre 1-9 µg, o entre 2-8 µg o adecuadamente entre 3-7 µg o 4-6 µg, o 5 µg.

La dosis de 3D-MPL y/o QS21 puede potenciar adecuadamente una respuesta inmunitaria a un antígeno en un ser humano. En particular, una cantidad de 3D-MPL y/o QS21 adecuada es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición no adyuvantada, o en comparación con la composición adyuvantada con otra cantidad de 3D-MPL o QS21, mientras que sea aceptable desde un perfil de reactogenicidad. Normalmente para administración humana, la saponina (por ejemplo, QS21) y/o el derivado de LPS (por ejemplo, 3D-MPL) estarán presentes a una dosis humana de composición inmunogénica en el intervalo de 1 µg - 200 µg, tal como 10-50 µg, o 1 µg - 25 µg por dosis.

En una realización específica, el adyuvante y las composiciones inmunogénicas comprenden una saponina (por ejemplo, QS21) y/o un derivado de LPS (por ejemplo, 3D-MPL) en una emulsión de aceite descrita anteriormente, junto con un esteroles (por ejemplo, colesterol). Estos esteroides son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, el colesterol se desvela en the Merck Index, 11ª ed., página 341, como un esteroles que se produce naturalmente

encontrado en grasa animal. Adicionalmente, la emulsión de aceite (en particular la emulsión de aceite en agua) puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina. Adyuvantes que comprenden una emulsión de aceite en agua, un esteroles y una saponina se describen en el documento WO 99/12565. Ejemplos de otros inmunostimulantes se describen en este documento y en "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, volumen 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

Si el escualeno y una saponina (opcionalmente QS21) están incluidos, también es beneficioso incluir un esteroles (opcionalmente colesterol) en la formulación ya que éste permite una reducción en el nivel de aceite total en la emulsión. Esto conduce a un coste reducido de fabricación, mejora de la comodidad global de la vacunación y también mejoras cualitativas y cuantitativas de las respuestas inmunitarias resultantes tales como producción de IFN- γ mejorada. Por consiguiente, el sistema de adyuvante normalmente comprende una relación de aceite metabolizable:saponina (peso/peso) en el intervalo de 200:1 a 300:1, por tanto la presente invención puede usarse en una forma de "bajo aceite" cuyo intervalo opcional es 1:1 a 200:1, opcionalmente 20:1 a 100:1, o sustancialmente 48:1, esta vacuna retiene las propiedades de adyuvante beneficiosas de todos los componentes, con un perfil de reactogenicidad muy reducido. Por consiguiente, algunas realizaciones tienen una relación de escualeno:QS21 (peso/peso) en el intervalo de 1:1 a 250:1, o 20:1 a 200:1, o 20:1 a 100:1, o sustancialmente 48:1. Opcionalmente también se incluye un esteroles (por ejemplo, colesterol) presente a una relación de saponina:esteroles como se describe en este documento. Los adyuvantes en los que opcionalmente está incluido un inmunostimulante adicional son particularmente adecuados para formulaciones de vacuna para lactantes y/o ancianos.

Por tanto, el adyuvante de emulsión de aceite en agua puede comprender opcionalmente además 5-60, 10-50 ó 20-30 μ g (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 μ g) de derivado de lípido A (por ejemplo, 3D-MPL). El adyuvante de aceite en agua puede contener opcionalmente 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3 ó 0,125-0,25 mg (por ejemplo, 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 ó 0,125 mg) de esteroles (por ejemplo, colesterol), 1-60, 10-50 ó 20-30 μ g (por ejemplo, 1-10, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 μ g) de derivado de lípido A (por ejemplo, 3D-MPL o cualquier derivado de lípido A sintético) y 1-60, 10-50 ó 20-30 μ g (por ejemplo, 1-10, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 μ g) de saponina (por ejemplo, QS21).

Cepas víricas de la gripe y antígenos de la gripe, pautas de vacunación, dosificación y criterios de eficacia

Dicho virus de la gripe o preparación antigénica del mismo puede derivarse de huevo o derivarse de cultivo celular. Por ejemplo, el antígeno del virus de la gripe o las preparaciones antigénicas del mismo según la invención pueden derivarse del procedimiento de huevos embrionados convencional cultivando el virus de la gripe en huevos y purificando el fluido alantoideo recogido. Los huevos pueden acumularse en grandes números a corto plazo. Alternativamente, pueden derivarse de cualquiera de los nuevos procedimientos de generación usando célula o cultivo celular para cultivar el virus o expresar antígenos de superficie del virus de la gripe recombinantes. Sustratos de células adecuados para cultivar el virus incluyen, por ejemplo, células de riñón de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células similares a MDCK, células de riñón de mono tales como células AGMK que incluyen células Vero, líneas celulares de cerdo adecuadas, o cualquier otro tipo de célula de mamífero adecuado para la producción del virus de la gripe para fines de vacuna. Sustratos de célula adecuados también incluyen células humanas, por ejemplo, células MRC-5 o la línea celular Per.C6. Los sustratos de células adecuados no se limitan a líneas celulares; por ejemplo, también están incluidas células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo y líneas celulares aviares tales como líneas celulares de pollo o pato (por ejemplo, línea celular EBx tal como EB14 o EB24 derivada de citoblastos embrionarios de pollo o pato, respectivamente). Células de insecto adecuadas son Sf9 o Hi5.

En una realización, un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo para su uso según la presente invención puede ser un virus de la gripe fraccionado o preparación antigénica del virus fraccionado del mismo. En una realización alternativa, la preparación contra la gripe puede contener otro tipo de antígeno de la gripe inactivado tal como virus completo inactivado o HA y NA purificadas (vacuna de subunidad), o un virusoma de la gripe. En todavía otra realización, el virus de la gripe puede ser una preparación contra la gripe atenuada viva.

Un virus de la gripe fraccionado o preparación antigénica de virus fraccionado del mismo para su uso según la presente invención es adecuadamente una preparación de virus inactivado en la que las partículas de virus se rompen con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envoltura lipídica. El virus fraccionado o las preparaciones antigénicas de virus fraccionado del mismo se preparan adecuadamente por fragmentación de virus de la gripe completos, tanto infecciosos como inactivados, con concentraciones solubilizantes de disolventes orgánicos o detergentes y posterior eliminación de todo o la mayoría del agente solubilizante y algo o la mayoría del material de lípidos víricos. Por preparación antigénica de virus fraccionado del mismo se indica una preparación de virus fraccionado que puede haberse sometido a algún grado de purificación en comparación con el virus fraccionado, mientras que retiene la mayoría de las propiedades antigénicas de los componentes del virus fraccionado. Por ejemplo, si se produce en huevos, el virus fraccionado puede estar agotado en proteínas contaminantes del huevo, o si se produce en cultivo celular, el virus fraccionado puede estar agotado en contaminantes de células huésped. Una preparación antigénica de virus fraccionado puede comprender componentes antigénicos de virus fraccionado de más de una cepa vírica. Las vacunas que contienen virus fraccionado (llamadas 'vacuna fraccionada de la gripe') o preparaciones antigénicas de virus fraccionado

generalmente contienen proteína de la matriz residual y nucleoproteína y algunas veces lípido, además de las proteínas de la envuelta de membrana. Tales vacunas de virus fraccionado normalmente contendrán todas o la mayoría de las proteínas estructurales del virus, aunque no necesariamente en las mismas proporciones que se producen en el virus completo. Ejemplos de vacunas fraccionadas comercialmente disponibles son, por ejemplo, FLUARIX™, FLUSHIELD™ o FLUZONE™.

Alternativamente, el virus de la gripe puede estar en forma de una vacuna de virus completo. Esto puede demostrar ser una ventaja con respecto a una vacuna de virus fraccionado para una situación pandémica ya que evita la incertidumbre de si puede producirse o no satisfactoriamente una vacuna de virus fraccionado para una nueva cepa de virus de la gripe. Para algunas cepas, los detergentes convencionales usados para producir el virus fraccionado pueden dañar el virus y hacerlo inservible. Aunque siempre existe la posibilidad de usar diferentes detergentes y/o desarrollar un procedimiento diferente para producir una vacuna fraccionada, esto llevaría tiempo, que puede no estar disponible en una situación pandémica. Además del mayor grado de certeza con un enfoque de virus completo, también hay una mayor capacidad de producción de vacunas que para virus fraccionado ya que se pierden cantidades considerables de antígeno durante las etapas de purificación adicionales necesarias para preparar una vacuna fraccionada adecuada.

En otra realización, la preparación del virus de la gripe esta en forma de una vacuna contra la gripe de subunidad purificada. Las vacunas contra la gripe de subunidad generalmente contienen las dos principales proteínas de la envuelta, HA y NA, y pueden tener una ventaja adicional con respecto a las vacunas de virión completo ya que son generalmente menos reactogénicas, particularmente en vacunados jóvenes. Las vacunas de subunidad pueden producirse tanto recombinantemente como purificarse a partir de partículas víricas rotas. Ejemplos de vacunas de subunidad comercialmente disponibles son, por ejemplo, AGRIPPAL™ o FLUVIRIN™. En una realización específica, las vacunas de subunidad se preparan a partir de al menos un componente de la envuelta principal tal como a partir de hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), o M2, adecuadamente a partir de HA. Adecuadamente comprenden combinaciones de dos antígenos o más, tales como una combinación de tanto HA como NA, que opcionalmente comprende M1. Adecuadamente, los componentes contra la gripe se producen por tecnología de ADN recombinante, es decir, resultan de, o se expresa en, un ácido nucleico resultante de manipulaciones de ADN recombinante, que incluyen vector recombinante vivo (variolovacuna) o proteína de subunidad recombinante (baculovirus/células de insecto, células de mamífero, células aviares, levadura, plantas o bacterias). Células de insecto adecuadas son células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) o células de insecto High Five (Hi5) desarrolladas de *Trichoplusia ni* (Invitrogen) y baculovirus adecuados son virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) (Baculogold, Becton Dickinson, PharMingen) o el llamado sistema Bacmid.

En una realización, la preparación del virus de la gripe está en forma de un virosoma. Los virosomas son vesículas unilaminares esféricas que retienen las glucoproteínas de la envoltura vírica funcionales HA y NA en conformación auténtica, intercalada en la membrana de bicapa de los fosfolípidos de virosomas. Ejemplos de vacunas virosómicas comercialmente disponibles son, por ejemplo, INFLEXAL V™ o INVAVAC™.

En otra realización, los componentes contra la gripe de subunidad se expresan en forma de partículas similares a virus (VLP) o capsómeros, adecuadamente VLP preparadas a partir de plantas o preparadas a partir de células de insecto. Las VLP presentan los antígenos en su forma nativa. La tecnología de subunidad de VLP puede basarse completamente en proteínas de la gripe, o puede basarse en otros virus tales como el virus de la leucemia murina (MLV) y, por tanto, pueden comprender un antígeno no de la gripe tal como la proteína MLV gag. Una VLP adecuada comprende al menos una, adecuadamente al menos dos proteínas de la gripe, opcionalmente con otras proteínas de la gripe o no de la gripe tales como M1 y HA, HA y NA, HA, NA y M1 o HA, NA y MLV gag. Pueden producirse tanto en células vegetales como en células de insecto. Las VLP también pueden llevar antígenos de más de una cepa de la gripe, tales como VLP preparadas a partir de dos cepas estacionales (por ejemplo, H1N1 y H3N2) o, por ejemplo, de una cepa estacional y una pandémica (por ejemplo, H3N2 y H5N1).

Por consiguiente, en una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende un antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo a partir de virus de la gripe cultivado en huevos o en cultivo celular. En otra realización, dicho antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo comprende un virus completo, un virus fraccionado, un virosoma o uno o más antígenos purificados elegidos de: HA, NA, M1, M2. En otra realización, dicho(s) antígeno(s) purificado(s) se prepara(n) a partir del virus de la gripe cultivado en células de mamífero, aviares o de insecto. Específicamente, dicho(s) antígeno(s) purificado(s) se produce(n) recombinantemente. Pueden estar en forma de una partícula similar a virus.

El antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo puede producirse por distintos procedimientos comercialmente aplicables, por ejemplo, el procedimiento de la gripe fraccionada descrito en las patentes nº DD 300 833 y DD 211 444. Tradicionalmente, la gripe fraccionada se produjo usando un tratamiento con disolvente/detergente, tal como fosfato de tri-n-butilo o éter dietílico en combinación con Tween™ (conocido como fraccionamiento con "Tween-éter") y este procedimiento se usa todavía en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de fraccionamiento ahora empleados incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo, desoxicolato de sodio como se describe en la patente nº DD 155 875. Detergentes que pueden usarse como agentes de fraccionamiento incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio

(CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, laurilsulfato, taurodesoxicolato, o detergentes no iónicos tales como los descritos anteriormente que incluyen Triton X-100 (por ejemplo, en un procedimiento descrito en Lina y col., 2000, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones de dos cualquiera o más detergentes.

5 El procedimiento de preparación para una vacuna fraccionada puede incluir varias etapas de filtración y/u otras de separación diferentes tales como etapas de ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación zonal y cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico) en una variedad de combinaciones, y opcionalmente una etapa de inactivación, por ejemplo, con calor, formaldehído o β -propiolactona o UV, que puede llevarse a cabo antes o después del fraccionamiento. El procedimiento de fraccionamiento puede llevarse a cabo como un procedimiento discontinuo, continuo o semicontinuo. Un procedimiento de fraccionamiento y purificación preferido para una composición
10 inmunogénica fraccionada se describe en el documento WO 02/097072.

Preparaciones de antígeno de la vacuna de la gripe fraccionado preferidas según la invención comprenden una cantidad residual de Tween 80 y/o Triton X-100 que queda del procedimiento de producción, aunque ésta puede añadirse o sus concentraciones ajustarse después de la preparación del antígeno fraccionado. En una realización, tanto Tween 80 como Triton X-100 están presentes. Los intervalos preferidos para las concentraciones finales de
15 estos tensioactivos no iónicos en la dosis de vacuna, que surgen de la preparación antigénica, son:

Tween 80: 0,01 al 1%, o aproximadamente 0,1% (volumen/volumen)
Triton X-100: 0,001 al 0,1 (% peso/volumen), o 0,005 al 0,02% (peso/volumen).

En una realización específica, la concentración final de Tween 80 que surge de la preparación antigénica oscila del 0,025%-0,09% peso/volumen. En otra realización específica, el antígeno se proporciona como una mezcla 2 veces concentrada que tiene una concentración de Tween 80 que oscila del 0,025%-0,2% (peso/volumen) y tiene que diluirse dos veces tras la formulación final con el adyuvante (o el tampón en la formulación de control).
20

En otra realización específica, la concentración final de Triton X-100 oscila del 0,004%-0,017% peso/volumen. En otra realización específica, el antígeno se proporciona como una mezcla 2 veces concentrada que tiene una concentración de Triton X-100 que oscila del 0,005%-0,034% (peso/volumen) y tiene que diluirse dos veces tras la formulación final con el adyuvante (o el tampón en la formulación de control).
25

En una realización, la preparación contra la gripe se prepara en presencia de bajo nivel de tiomersal, o en ausencia de tiomersal. En otra realización, la preparación contra la gripe resultante es estable en ausencia de conservantes organomercuriales, en particular la preparación no contiene tiomersal residual. En particular, la preparación del virus de la gripe comprende un antígeno de hemaglutinina estabilizado en ausencia de tiomersal, o a bajos niveles de tiomersal (generalmente 5 μ g/ml o menos). Específicamente, la estabilización de la cepa de la gripe B se realiza por un derivado de alfa-tocoferol, tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E, es decir, VES). Tales preparaciones y procedimientos para prepararlas se desvelan en el documento WO 02/097072.
30

Una composición preferida contiene tres antígenos de virión fraccionados inactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por la OMS de la estación de la gripe apropiada.
35

En una realización, el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y el adyuvante según la invención están contenidos en el mismo recipiente. Se denomina en lo sucesivo 'enfoque de un vial'. En otra realización, el vial es una jeringuilla precargada. En una realización alternativa, el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y adyuvante según la invención están contenidos en recipientes o viales separados y se mezclan poco antes o con la administración al sujeto. Se denomina en lo sucesivo 'enfoque de dos viales'. Adecuadamente, la vacuna de 2 componentes consiste en 0,5 ml de antígenos de virión fraccionados inactivados concentrados presentados en un vial de vidrio de tipo I (recipiente de antígeno) y de una jeringuilla de vidrio de tipo I precargada que contiene 0,5 ml del adyuvante (recipiente de adyuvante). Alternativamente, la vacuna es una vacuna de 2 componentes presentada en 2 viales (uno para el antígeno, uno para adyuvante, de 10 dosis cada uno) para la mezcla antes de la administración al primer paciente en el plazo de 24 horas a temperatura ambiente y posterior almacenamiento a 4°C durante un breve periodo de tiempo (por ejemplo, hasta una semana) para la posterior administración. En el momento de la inyección, el contenido del vial multidosis o la jeringuilla que contiene el adyuvante se inyecta en el vial que contiene el antígeno de virión fraccionado concentrado. Después de mezclar el contenido se saca en la jeringuilla y la aguja se sustituye por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata contra la gripe adyuvantada reconstituida se corresponde con 0,5 ml.
40
45
50

En una realización, cada dosis humana de la composición inmunogénica contiene 15 μ g de HA por cepa de la gripe por dosis, como se ha determinado por SRID. Esto es particularmente útil para la población anciana.

Un aspecto importante de la presente invención es el hecho de que el (los) antígeno(s) de la gripe pueda(n) usarse a menores cantidades a las que previamente se había creído que eran útiles, adecuadamente a un nivel de menos de 15 μ g HA por cepa de virus, por ejemplo, entre 1 y 10 μ g HA por cepa, por dosis humana de la composición inmunogénica.
55

Por consiguiente, en una realización, cada dosis humana de la composición inmunogénica contiene una dosis baja

de hemaglutinina (HA), definida como una cantidad inferior a 15 µg de HA por dosis, adecuadamente inferior a 10 µg, como se mide por inmunodifusión radial simple (SRD) (J.M. Wood y col.; J. Biol. Stand 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col.. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). En una realización más específica de la composición inmunogénica de la invención, el antígeno del virus o preparación antigénica es inferior a 10 ug, o inferior a 8 ug, o inferior a 4 ug, o inferior a 2 ug, o inferior a 1 ug, o inferior a 0,5 ug, o inferior a 0,1 ug HA por dosis humana por cepa de la gripe. Dicha baja cantidad de HA puede ser tan baja como sea prácticamente factible que permita formular una vacuna que cumpla los criterios internacionales, por ejemplo, EU o FDA, para eficacia, como se detalla más adelante (véase la Tabla 2 y los parámetros específicos que se exponen).

Una dosis de vacuna de 0,5 ml se usa adecuadamente. También es adecuada una dosis de vacuna de 1 ml (0,5 ml de adyuvante más 0,5 ml de preparación de antígeno). Ventajosamente, una dosis de vacuna según la invención, en particular una baja cantidad de vacuna de HA, puede proporcionarse en un volumen más pequeño que las vacunas de la gripe fraccionadas inyectadas convencionales, que son generalmente aproximadamente 0,5, 0,7 ó 1 ml por dosis. Las dosis de bajo volumen según la invención son adecuadamente inferiores a 500 µl, normalmente inferiores a 300 µl y adecuadamente no superiores a aproximadamente 200 µl o menos por dosis. La ligera adaptación del volumen de dosis se hará rutinariamente dependiendo de la concentración de HA en la muestra a granel original, o dependiendo de la vía de administración con dosis más pequeñas que se administran por vía intranasal o intradérmica, o dependiendo de la población diana (por ejemplo, los lactantes pueden recibir la mitad de una dosis humana de adulto).

Adecuadamente, la cepa o cepas del virus de la gripe que van a incluirse en la composición inmunogénica o de vacuna es/son cepa(s) (estacional(es)) interpandémica(s), o cepa(s) que están(n) asociada(s) a un brote pandémico o que tiene(n) la posibilidad de asociarse a un brote pandémico, o adecuadamente, en una composición multivalente, una mezcla de estas cepas.

Las cepas interpandémicas son, por ejemplo, cepas que circulan globalmente durante periodos interpandémicos tales como, pero no se limitan a: H1N1, H1N2, H3N2 o B. Las vacunas contra la gripe comercialmente disponibles son una combinación trivalente que incluye una cepa de la gripe B y dos cepas de la gripe A (H1N1, H3N2).

Las características de una cepa del virus de la gripe que tienen el potencial de producir una pandemia o un brote de la enfermedad de la gripe asociada a cepas pandémicas de la gripe son: contiene una nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas actualmente en circulación y, por tanto, casi todas las personas están sin tratamiento inmunológico previo; puede transmitirse horizontalmente en la población humana; y es patógena para seres humanos. Una hemaglutinina puede ser una que no haya sido evidente en la población humana durante un periodo de tiempo prolongado, probablemente varias décadas, tal como H2, o puede ser una hemaglutinina que no ha estado en circulación en la población humana antes, por ejemplo, H5, H9, H7 o H6 que se encuentran en especies aviares (aves). En cualquier caso, la mayoría, o al menos una gran proporción de, o incluso toda la población, no se ha encontrado previamente con el antígeno y no ha recibido previamente tratamiento inmunológico a él. Actualmente, el virus de la gripe A que se ha identificado por la OMS como uno que posiblemente podría producir una pandemia en seres humanos es el virus de la gripe aviar H5N1 altamente patógeno. Por tanto, la vacuna pandémica según la invención comprenderá adecuadamente el virus H5N1. Dos otras cepas adecuadas para inclusión en la composición reivindicada son H9N2 o H7N1.

Ciertas partes están generalmente a un mayor riesgo de ser infectadas por la gripe en una situación pandémica. Los ancianos, los niños crónicamente enfermos y pequeños son particularmente susceptibles, pero muchas personas jóvenes y aparentemente sanas también están en riesgo. Para la gripe H2, la parte de la población nacida después de 1968 tiene un riesgo elevado. Es importante que estos grupos se protejan eficazmente tan pronto como sea posible y de una forma sencilla.

Otro grupo de personas que tienen un riesgo elevado son los viajeros. Las personas viajan ahora mucho más que antes y las regiones en las que emergen la mayoría de los nuevos virus, China y el sudeste asiático, se han convertido en destinos de viaje populares en los últimos años. Este cambio en los patrones de viajar permite que nuevos virus alcancen todo el globo en cuestión de semanas en vez de meses o años.

Por tanto, para estos grupos de personas hay una necesidad particular de vacunación para proteger contra la gripe en una situación pandémica o una posible situación pandémica. Cepas adecuadas son, pero no se limitan a: H5N1, H5N8, H5N9, H7N4, H9N2, H7N7, H7N3, H2N2 y H7N1. Otras cepas pandémicas en seres humanos: H7N3 (2 casos informados en Canadá), H10N7 (2 casos informados en Egipto) y H5N2 (1 caso informado en Japón) y H7N2. Una cepa de la gripe que es una cepa pandémica o una cepa susceptible a asociarse a una pandemia se denominará resumidamente en este documento una "cepa pandémica".

El medicamento contra la gripe de la invención cumple adecuadamente ciertos criterios internacionales para vacunas. Los patrones se aplican internacionalmente para medir la eficacia de las vacunas contra la gripe. Las variables serológicas se evalúan según criterios de la Agencia europea de evaluación de los medicamentos para uso humano (CHMP/BWP/214/96, Comité de especialidades farmacéuticas (CEF). *Nota para la armonización de requisitos para vacunas contra la gripe*, 1997. Circular de CHMP/BWP/214/96 nº 96-0666:1-22) para ensayos clínicos relacionados con los procedimientos para el trámite de licencias anuales de vacunas contra la gripe (Tabla

2). Los requisitos son diferentes para poblaciones adultas (18-60 años) y poblaciones ancianas (>60 años) (Tabla 2). Para las vacunas contra la gripe interpandémicas, al menos una de las evaluaciones (factor de seroconversión, tasa de seroconversión, tasa de seroprotección) debería cumplir los requisitos europeos para todas las cepas de la gripe incluidas en la vacuna. La proporción de títulos iguales o superiores a 1:40 se considera lo más relevante debido a que se espera que estos títulos sean los que mejor establezcan una correlación con la protección [Beyer W y col. 1998. Clin Drug Invest.;15:1-12].

Como se especifica en "Guideline on dossier structure and content for pandemic influenza vaccine marketing authorisation application" (CHMP/VEG/4717/03, 5 de abril de 2004, o más recientemente EMEA/CHMP/WP/263499/2006 de 24 de enero de 2007 titulada 'Guidelines on flu vaccines prepared from viruses with a potencial to cause a pandemic', disponible en www.emea.eu.int), en ausencia de criterios específicos para vacunas contra la gripe derivadas de cepas no circulantes se tiene previsto que una vacuna candidata pandémica deba (al menos) poder provocar suficientes respuestas inmunológicas para cumplir adecuadamente los tres presentes patrones fijados para vacunas existentes en sujetos adultos o ancianos sin sensibilizar, después de dos dosis de vacuna. La directriz de la EMEA describe la situación de que en caso de una pandemia la población estará inmunológicamente sin tratamiento previo y, por tanto, se asume que los tres criterios del CHMP para vacunas estacionales se cumplirán por vacunas candidatas pandémicas. No se requiere requisito explícito para demostrarlo en sujetos seronegativos antes de la vacunación.

Las composiciones de la presente invención cumplen adecuadamente al menos uno de tales criterios para la cepa pandémica incluida en la composición (un criterio es suficiente para obtener la autorización), adecuadamente al menos dos, o normalmente al menos los tres criterios para la protección como se expone en la Tabla 2A.

Tabla 2A (criterios del CHMP)

| | 18 - 60 años | > 60 años |
|---|--------------|-----------|
| Tasa de seroconversión* | >40% | >30% |
| Factor de conversión** | >2,5 | >2,0 |
| Tasa de protección*** | >70% | >60% |
| <p>* La tasa de seroconversión se define como la proporción de sujetos en cada grupo que tiene un título protector después de la vacunación $\geq 1:40$. La tasa de seroconversión puesta simplemente es el % de sujetos que tienen un título de HI antes de la vacunación de $<1:10$ y $\geq 1:40$ después de la vacunación. Sin embargo, si el título inicial es $\geq 1:10$, entonces necesita haber al menos un aumento de cuatro veces en la cantidad de anticuerpo después de la vacunación.</p> <p>** El factor de conversión se define como el aumento en veces en los títulos medios geométricos (GMT) de HI en suero después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.</p> <p>*** La tasa de protección se define como la proporción de sujetos que tanto fueron seronegativos antes de la vacunación y tienen un título de HI después de la vacunación (protector) de $\geq 1:40$ como que fueron seropositivos antes de la vacunación y tienen un aumento significativo de 4 veces en el título después de la vacunación; está normalmente aceptado como que indica protección.</p> | | |

Una tasa de seroprotección del 70% definida por la autoridad reguladora de la salud europea (CHMP - Comité de medicamentos de uso humano) es uno de los tres criterios normalmente requeridos que sean cumplidos por una vacuna contra la gripe estacional anual y que el CHMP también está esperando que cumpla una vacuna candidata pandémica. Sin embargo, el modelado matemático ha indicado que una vacuna que, al nivel de población, sólo es eficaz el 30% contra ciertas cepas desviadas también pueden ser beneficioso en ayudar a reducir la magnitud de una pandemia y que una campaña de vacunación pandémica usando una vacuna (prepandémica) con un 30% de eficacia contra la cepa pandémica (protección cruzada del 30%) podría reducir eficazmente el 75% la tasa de ataque clínico y, por consiguiente, la morbilidad/mortalidad dentro de la población (Ferguson y col., Nature 2006).

La FDA ha publicado un borrador orientativo (borrador de criterios del CBER) (disponible de la Oficina de comunicación, capacitación y asistencia a fabricantes (HFM-40), 1401 Rockville Pike, Suite 200N, Rockville, MD 20852-1448, o llamando al 1-800-835-4709 o 301-827-1800, o de internet en <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>) sobre datos clínicos necesarios para apoyar la licencia de vacunas contra la gripe pandémicas, y los criterios propuestos también se basan en los criterios del CHMP. La FDA usa puntos de corte de edad ligeramente diferentes. Los puntos finales apropiados incluyen similarmente: 1) el porcentaje de sujetos que consiguen un título de anticuerpos de HI $\geq 1:40$, y 2) tasas de seroconversión, definidas como un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos de HI después de la vacunación. El título medio geométrico (GMT) debería incluirse en los resultados, pero los datos deben incluir no sólo la estimación puntual, sino también el límite inferior del intervalo de confianza del 95% de la tasa de incidencia de seroconversión, y la tasa de incidencia del día 42 de títulos de HI \geq

1:40 debe exceder el valor diana. Por tanto, deben proporcionarse estos datos y los intervalos de confianza del 95% (CI) de las estimaciones puntuales de estas evaluaciones. El borrador orientativo de la FDA requiere que se cumplan ambos objetivos. Esto se resume en la Tabla 2B.

Tabla 2B (borrador de criterios del CBER)

| | 18 - 64 años | > 64 años |
|---|--------------|-----------|
| Tasa de seroconversión * | >40% | >30% |
| Tasa de títulos de HI \geq 1:40 | >70% | >60% |
| <p>*La tasa de seroconversión se define como: a) para sujetos con un título inicial \geq 1:10, un aumento de 4 veces o mayor; o b) para sujetos con un título inicial < 1:10, un aumento a \geq 1:40.</p> <p>Estos criterios deben cumplirse en el intervalo inferior del IC del 95% para el valor real.</p> | | |

5

Por consiguiente, se proporciona una composición, procedimiento o uso como se reivindica en este documento en el que dicha respuesta inmunitaria o protección inducida por la administración de la composición contra la gripe contemplada cumple los tres criterios reguladores de la UE para la eficacia de vacunas contra la gripe. Adecuadamente al menos uno, adecuadamente dos, o tres de los siguientes criterios se cumplen para la cepa o cada cepa de la composición:

10

- una tasa de seroconversión de >50%, de >60%, de >70%, adecuadamente de >80% o >90% en la población adulta (18-60 años), y/o adecuadamente también en la población anciana (>60 años);
- una tasa de protección de >75%, de >80%, de >85%, adecuadamente de >90% en la población adulta (18-60 años), y/o adecuadamente también en la población anciana (>60 años);
- un factor de conversión de >4,0, de >5,0, de >6,0, de >7,0, de >8,0, de >9,0 o de 10 o por encima de 10 en la población adulta (18-60 años), y/o adecuadamente también en la población anciana (>60 años).

15

En una realización específica, la composición cumplirá tanto una tasa de seroconversión de >60%, o >70% o adecuadamente >80%, como una tasa de protección de >75%, adecuadamente de >80% en la población adulta. En otra realización específica, la composición según la invención cumplirá tanto un factor de conversión de >5,0, o >7,0 o adecuadamente >10,0 como una tasa de seroconversión de >60%, o >70%, o adecuadamente >80% en la población adulta. En otra realización específica, la composición según la invención cumplirá tanto un factor de conversión de >5,0, o >7,0 o adecuadamente >10,0 como una tasa de protección de >75%, adecuadamente >80% en la población adulta. En otra realización específica adicional, la composición según la invención cumplirá tanto un factor de conversión de 10,0 o superior, una tasa de seroconversión del 80% o superior, como una tasa de protección del 80% o superior.

25

En otra realización, la vacuna reivindicada, adecuadamente una vacuna prepandémica que contiene una cepa pandémica o una cepa susceptible a asociarse a una pandemia, tendrá 30% de eficacia contra la cepa pandémica en circulación (protección cruzada del 30%). En particular, la vacuna reivindicada cumplirá una tasa de seroprotección de al menos el 30% contra cepas desviadas, adecuadamente de al menos el 40%, o >50% o >60% contra cepas desviadas. Adecuadamente, la tasa de seroprotección será >70%, o adecuadamente >80% contra cepas de desviación. Dicha vacuna prepandémica, que puede conferir protección cruzada, podrá reducir sustancialmente la tasa de ataque por infección global, al menos el 50%, o adecuadamente al menos el 75%, y por consiguiente la morbilidad/mortalidad dentro de la población.

30

En todavía otra realización, la vacuna adyuvantada reivindicada puede inducir anticuerpos neutralizantes en al menos el 50% de los sujetos, al menos el 60%, adecuadamente al menos el 70%, o adecuadamente más del 75% de los sujetos contra una cepa desviada o una cepa de un subtipo diferente. Adecuadamente, este efecto se logra con una dosis baja de antígeno, tal como con 7,5 μ g de HA o incluso una dosis menor de antígeno tal como 3,8 μ g o 1,9 μ g de HA.

35

Adecuadamente, cualquiera o todos de tales criterios también se cumplen para otras poblaciones, tales como en niños y en cualquier población inmunodeprimida.

40

En un aspecto, la dosis humana de la composición inmunogénica contiene una hemaglutinina (HA) de una única cepa de la gripe, y se denomina en lo sucesivo una composición contra la gripe "monovalente". En otro aspecto de la invención, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende hemaglutinina (HA) de más de una cepa de la gripe, y se denomina en lo sucesivo una composición contra la gripe "multivalente". Una composición multivalente adecuada según la invención es una composición bivalente (que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas del virus de la gripe tales como, pero no exclusivamente, dos cepas asociadas a una pandemia o susceptibles a

45

asociarse a una pandemia, por ejemplo, H5+H2), una composición trivalente (que comprende hemaglutinina (HA) de tres cepas del virus de la gripe, opcionalmente de dos cepas A y una cepa B tal como, pero no se limitan a, B/Yamagata o B/Victoria), una composición cuadrivalente (que comprende hemaglutinina (HA) de cuatro cepas del virus de la gripe) o una composición pentavalente (que comprende hemaglutinina (HA) de cinco cepas del virus de la gripe). Una composición cuadrivalente adecuada comprende hemaglutinina de dos cepas A y dos cepas B de diferente linaje (tal como B/Yamagata o B/Victoria). Alternativamente, una composición cuadrivalente comprende hemaglutinina de tres cepas A (opcionalmente H1N1, H3N2, y una cepa A asociada a una pandemia o susceptible a asociarse a una pandemia) y una cepa B (tal como B/Yamagata o B/Victoria). Otra composición cuadrivalente alternativa comprende hemaglutinina de cuatro cepas A de una cepa asociada a una pandemia o susceptible a asociarse a una pandemia, tal como cepas aviares tales como H5 + H2 + H7 + H9. Específicamente, una composición pandémica adyuvantada multivalente tal como una bivalente (por ejemplo, H5+H2) o trivalente o cuadrivalente pandémica (por ejemplo, H5 + H2 + H7 + H9) ofrece la ventaja de una inmunización de anticipación contra subtipos de amenazas de la gripe A pandémica pandémico de la gripe A y sensibilización duradera contra subtipos de amenazas. Normalmente se administran dos dosis a partir de las 6 semanas de edad usando un programa conveniente (por ejemplo, separadas 6-12 meses), y opcionalmente un refuerzo periódico previsto (por ejemplo, 10 años). Opcionalmente, una vacuna pandémica tal puede combinarse con una vacuna estacional.

Una composición multivalente también puede comprender más de 5 cepas de la gripe tales como 6, 7, 8, 9 ó 10 cepas de la gripe.

Si se usan dos cepas B en una composición estacional multivalente, pueden ser de dos linajes diferentes (opcionalmente de B/Victoria y B/Yamagata). Al menos una de dicha cepa B, adecuadamente ambas cepas B, serán de un linaje en circulación. Una composición tal es particularmente adecuada para niños. Adecuadamente, si la composición multivalente para su uso en niños incluye dos cepas B, la cantidad de antígeno normalmente asignada a la cepa B se divide entre las dos cepas B. Específicamente, la vacuna contra la gripe cuadrivalente adyuvantada (H1+H3+ambos linajes B) ofrece la ventaja de profilaxis potenciada para niños sin tratamiento previo y su eficacia superior en comparación con vacunas sin adyuvante (en términos de tanto protección homóloga como desviada, y su eficacia contra los dos linajes B en circulación) y de posible inmunización todo el año basándose en la edad. Una dosis o dos dosis se administran adecuadamente ya desde la edad de 6 semanas, o entre 6 y 35 meses.

En una realización específica, la dosis humana de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna trivalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas A (opcionalmente H1N1, H3N2) y una cepa B. Adecuadamente, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 µg de HA por cepa o inferior) y es como se define anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa es aproximadamente o inferior a 5 µg, aproximadamente 2,5 µg o inferior. El adyuvante es como se define en este documento y en particular como se define en la Tabla 1. Adecuadamente, la composición de adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 5-6 mg, entre 5-6 mg y entre 2-3 mg por dosis, respectivamente. Alternativamente, las composiciones de adyuvante son una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2,5-3,5 mg, entre 2-3 mg y entre 1-2 mg por dosis, respectivamente. Estas composiciones adyuvantadas inmunogénicas o vacunas son particularmente adecuadas para la población adulta (18-60 años) o de niños mayores (3-17 años) y puede proporcionar protección cruzada contra variantes de desviación de H3N2 y contra cepa B de un linaje diferente.

En otra realización específica, la dosis humana de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna cuadrivalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas A (opcionalmente H1N1, H3N2) y dos cepas B (opcionalmente de un linaje diferente, tal como de B/Victoria y B/Yamagata). Adecuadamente, la HA por cepa por dosis es aproximadamente 15 µg. Adecuadamente, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente de aproximadamente 10 µg de HA por cepa por dosis o inferior, de forma que se logre un máximo de 40-45 µg de HA por dosis) y es como se define anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa es aproximadamente o inferior 5 µg, aproximadamente 2,5 µg o inferior. El adyuvante es como se define en este documento y en particular como se define en la Tabla 1. Adecuadamente, la composición de adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 5-6 mg, entre 5-6 mg y entre 2-3 mg por dosis, respectivamente. Alternativamente, la composición de adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2,5-3,5 mg, entre 2-3 mg y entre 1-2 mg por dosis, respectivamente. Una composición tal que comprende una segunda cepa B es particularmente adecuada para niños muy jóvenes, especialmente cuando la exposición previa o sensibilización es importante. El adyuvante proporcionará la ventaja de administrar a esta población un aumento de protección. La dosis humana de la composición inmunogénica para la población de niños es adecuadamente la mitad de una dosis humana adulta, y comprenderá adecuadamente 2,5 µg de HA por cepa, y una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2,5-3,5 mg, entre 2-3 mg y entre 1-2 mg por dosis.

Alternativamente, dicha cepa B adicional, adecuadamente con las características y a la cantidad definida anteriormente con respecto a la composición cuadrivalente, puede añadirse en forma de una composición monovalente a una composición trivalente como se ha descrito anteriormente. El uso de una baja cantidad de HA tal como de o inferior a 10 µg, o de o inferior a 5 µg, u opcionalmente para niños jóvenes de o inferior a 2,5 µg, tendría la ventaja de limitar el impacto de una adición de cepa de la gripe sobre el suministro de vacuna global.

Adecuadamente, cuando dos cepas B están incluidas en la composición de vacuna, la cantidad de antígeno normalmente asignada a la cepa B se divide entre las dos cepas B.

En otra realización específica, la dosis humana de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna cuadrivalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas A interpandémicas (opcionalmente H1N1, H3N2), una cepa B y una cepa A asociada a una pandemia o susceptible a asociarse a una pandemia (opcionalmente H5N1, H9N2, H7N7, H5N8, H5N9, H7N4, H7N3, H2N2, H10N7, H5N2, H7N2 y H7N1). Adecuadamente, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 µg de HA por cepa o inferior) y es como se define anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa es aproximadamente o inferior a 5 µg, aproximadamente 2,5 µg o inferior. El adyuvante de la invención es como se define en este documento y en particular como se define en la Tabla 1.

En otra realización específica, la dosis humana de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna cuadrivalente que comprende hemaglutinina (HA) de tres cepas A interpandémicas (opcionalmente H1N1, y dos cepas H3N2) y una cepa B. Adecuadamente, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 µg de HA por cepa o inferior) y es como se define anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa es aproximadamente o inferior a 5 µg, aproximadamente 2,5 µg o inferior. El adyuvante es como se define en este documento y en particular como se define en la Tabla 1. Una composición tal que comprende una tercera cepa A estacional es particularmente adecuada para niños muy jóvenes. Adecuadamente, dos de las tres cepas interpandémicas son la cepa H3N2, siendo la segunda cepa H3N2 de un subtipo próximo, o distante, en comparación con la primera cepa H3N2. El adyuvante proporcionará la ventaja de proporcionar a esta población un aumento de protección. La dosis humana de la composición inmunogénica para la población de niños es adecuadamente la mitad de una dosis humana adulta.

En otra realización específica, la dosis humana de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna pentavalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas A interpandémicas (opcionalmente H1N1, H3N2), dos cepas B (opcionalmente de un linaje diferente, tal como de B/Victoria y B/Yamagata) y una cepa A asociada a una pandemia o susceptible a asociarse a una pandemia (opcionalmente H5N1, H9N2, H5N8, H5N9, H7N4, H7N7, H7N3, H2N2, H10N7, H5N2 y H7N1). Adecuadamente, la HA por cepa por dosis es aproximadamente 15 µg. Adecuadamente, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente de aproximadamente 10 µg de HA por cepa por dosis o inferior, de forma que se logre un máximo de 40-45 µg de HA por dosis) y es como se define anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa es aproximadamente o inferior a 5 µg, aproximadamente 2,5 µg o inferior. El adyuvante es como se define en este documento y en particular como se define en la Tabla 1.

En otra realización específica, la dosis humana de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna pentavalente que comprende hemaglutinina (HA) de tres cepas A interpandémicas (opcionalmente H1N1, y dos cepas H3N2) y dos cepas B (opcionalmente de un linaje diferente, tal como de B/Victoria y B/Yamagata). Adecuadamente, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 µg de HA por cepa o inferior) y es como se define anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa es aproximadamente o inferior a 5 µg, aproximadamente 2,5 µg o inferior. El adyuvante es como se define en este documento y en particular como se define en la Tabla 1.

Por consiguiente, en una realización específica, la invención proporciona una composición inmunogénica contra la gripe que comprende escualeno y HA en la que la relación de peso de escualeno:cantidad total de HA (incluidas todas las cepas de la gripe) está en el intervalo de entre aproximadamente 50-150 o aproximadamente 150-400 (por ejemplo, aproximadamente 200-300). Tales composiciones son adecuadamente, pero no exclusivamente, para su uso en la población anciana y equilibran bien reactogenicidad e inmunogenicidad. En otra realización, la invención proporciona una composición inmunogénica contra la gripe que comprende escualeno y HA en la que la relación de peso de escualeno:cantidad total de HA (incluidas todas las cepas de la gripe) está entre aproximadamente 50-400, por ejemplo, aproximadamente 50-100, 75-150, 75-200, 75-400, 100-200, 100-250 ó 200-400. La relación será adecuadamente de forma que se cumplan al menos dos, adecuadamente los tres criterios (Tabla 2) para protección, para una población específica. Puede incluirse un agonista de TLR, adecuadamente un agonista de TLR-4 (por ejemplo, elegido de: 3D-MPL, MPL; una molécula de AGP tal como RC527 o RC529 o ER804057) o TLR-9 (adecuadamente un oligonucleótido de CpG, por ejemplo, CpG7909). Relaciones de peso de escualeno:TLR-4 adecuadas son entre aproximadamente 100-450, por ejemplo, 50-250, 50-150, 100-250, 200-250, 350-450. Relaciones de peso de escualeno:TLR-9 adecuadas son entre aproximadamente 50-1000, por ejemplo, 50-500, 100-1000, 100-400, 400-600. La HA puede ser de cepas de la gripe estacionales. Tales composiciones son adecuadamente, pero no exclusivamente, para su uso en las poblaciones adultas o pediátricas y equilibran bien reactogenicidad e inmunogenicidad. Adecuadamente, la HA es de al menos tres, al menos cuatro cepas de la gripe. Adecuadamente están presentes tres cepas estacionales (por ejemplo, H1N1, H3N2, B). Adecuadamente, si están presentes cuatro cepas, son del grupo de: cuatro cepas estacionales (por ejemplo, H1N1, H3N2, dos cepas B; o H1N1, B, dos cepas H3N2) o el grupo de una cepa pandémica (por ejemplo, aviar) más tres cepas estacionales (por ejemplo, H1N1, H3N2, B).

Todas las composiciones inmunogénicas adyuvantadas reivindicadas o vacuna pueden basarse ventajosamente en el adyuvante para proporcionar una respuesta inmunitaria persistente durante un periodo de tiempo que supera 6 meses, adecuadamente 12 meses después de la vacunación.

Adecuadamente, la(s) respuesta(s) anterior(es) se obtiene(n) después de una dosis, o normalmente después de dos dosis administradas durante la misma respuesta inmunitaria primaria continua. Es una ventaja particular de la composición reivindicada que la respuesta inmunitaria se obtenga después de sólo una dosis de composición adyuvantada o vacuna. También es adecuado que se administren dos dosis durante la misma respuesta inmunitaria primaria continua, adecuadamente para poblaciones o individuos sin tratamiento previo o inmunodeprimidos. Adecuadamente, dos dosis podrían necesitarse en niños, en particular de menos de 6 años de edad o 9-10 años de edad, no previamente vacunados.

Por consiguiente, se proporciona el uso de una preparación de antígeno del virus de la gripe pandémico no vivo, en particular un virus de la gripe fraccionado o preparación antigénica del mismo, en la preparación de una composición de vacuna para una vacunación de una dosis o de dos dosis contra la gripe, en el que la vacunación de una dosis o de dos dosis genera una respuesta inmunitaria que cumple al menos uno, adecuadamente dos o tres, requisitos reguladores internacionales para vacunas contra la gripe. En otra realización particular, dicha vacunación de una dosis genera también o adicionalmente una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 y/o una respuesta de linfocitos B de memoria que es superior a la obtenida con la vacuna no adyuvantada. En una realización particular, dicha respuesta inmunitaria es una respuesta de anticuerpos de reactividad cruzada o una respuesta de linfocitos T CD4 de reactividad cruzada, o ambas. En una realización específica, el paciente humano no ha recibido previamente tratamiento inmunológico (es decir, no tiene inmunidad preexistente) a la cepa de vacunación. Específicamente, la composición de vacuna contiene una baja cantidad de antígeno de HA y un adyuvante de emulsión de aceite en agua con componentes a un nivel inferior al que previamente se había creído útil, y cantidades que son como se definen en este documento. Específicamente, la composición de vacuna es como se define en este documento. En particular, las propiedades inmunogénicas de la composición de vacuna son como se definen en este documento. Adecuadamente, la vacuna se administra intramuscularmente.

Propiedades inmunogénicas de la composición inmunogénica usada para la vacunación (opcionalmente la primera vacunación) de la presente invención

En la presente invención, la composición inmunogénica adyuvantada es capaz de inducir adecuadamente una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ mejorada contra el o contra al menos uno de los antígenos del componente o composición antigénica en comparación con la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ obtenida con la composición correspondiente que es no adyuvantada, es decir, no contiene ningún adyuvante exógeno (también denominada en lo sucesivo "composición simple"). En una realización específica, si la composición contra la gripe inmunogénica es de varias cepas de la gripe, siendo una tanto una segunda cepa B, o una tercera cepa A interpandémica, como una cepa pandémica, dicha respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ mejorada es contra al menos una de estas cepas. En otra realización, la composición inmunogénica adyuvantada, si el (los) componente(s) de adyuvante está(n) a un menor nivel que el que se creía previamente útil y es/son normalmente como se define(n) anteriormente, es adecuadamente capaz de inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ contra el o contra al menos uno de los antígenos del componente o composición antigénica al menos comparable a la que se obtiene con composiciones adyuvantadas con algunos adyuvantes de la técnica anterior. Esta característica se denominará en lo sucesivo "respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ comparable" en el texto de más adelante.

Por "respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ mejorada" se indica que se obtiene una mayor respuesta de CD4+ en un paciente humano después de la administración de la composición inmunogénica adyuvantada como se define en este documento que la obtenida después de la administración de la misma composición sin adyuvante. Por ejemplo, se obtiene una mayor respuesta de linfocitos T CD4+ en un paciente humano tras la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo junto con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable (opcionalmente escualeno), un tocol (opcionalmente alfa-tocoferol) y un agente emulsionante (opcionalmente un monooleato de polioxietilensorbitano tal como Tween 80™ o Polisorbato 80™) en comparación con la respuesta inducida después de la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que es no adyuvantada. Tal formulación adyuvantada se usará ventajosamente para inducir respuesta de linfocitos T CD4+ contra la gripe que puede detectar epítopes de la gripe presentados por moléculas del MHC de clase II.

Adecuadamente, dicha respuesta inmunológica inducida por una composición contra la gripe fraccionada adyuvantada para su uso en la presente invención es superior a la respuesta inmunológica inducida por cualquier otra vacuna convencional contra la gripe no adyuvantada, tal como vacuna contra la gripe de subunidad o vacuna contra el virus de la gripe completo.

En particular, pero no exclusivamente, dicha "respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ mejorada" o "respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ comparable" se obtiene en un paciente inmunológicamente sin sensibilizar, es decir, un paciente que es seronegativo a dicho virus de la gripe o antígeno. Esta seronegatividad puede ser el resultado de que dicho paciente nunca se haya enfrentado a tal virus o antígeno (llamado paciente 'sin tratamiento previo') o, alternativamente, que haya fracasado en responder a dicho antígeno una vez encontrado. Adecuadamente, dicha respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ mejorada se obtiene en un sujeto inmunodeprimido tal como un anciano, normalmente de al menos 50 años de edad, normalmente 65 años de edad o superior, o un adulto de menos de 65

años de edad con una afección médica de alto riesgo (adulto de 'alto riesgo'), o un niño de menos de dos años.

La respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ (mejorada) puede evaluarse midiendo el número de células que produce cualquiera de las siguiente citocinas:

- células que producen al menos dos citocinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)
- 5 • células que producen al menos CD40L y otra citocina (IL-2, TNF α , IFN γ)
- células que producen al menos IL-2 y otra citocina (CD40L, TNF α , IFN γ)
- células que producen al menos IFN γ y otra citocina (IL-2, TNF α , CD40L)
- células que producen al menos TNF α y otra citocina (IL-2, CD40L, IFN γ)

10 Habrá respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ "mejorada" cuando las células que producen cualquiera de las citocinas anteriores estén en una mayor cantidad tras la administración de la composición adyuvantada en comparación con la administración de la composición no adyuvantada. Normalmente se satisfarán al menos una, adecuadamente dos de las cinco condiciones mencionadas en este documento anteriormente. En una realización particular, las células que producen las cuatro citocinas estarán presentes a una mayor cantidad en el grupo adyuvantado en comparación con el grupo no adyuvantado. Habrá una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ "comparable" cuando no haya disminución significativa, opcionalmente no estadísticamente significativa, en la respuesta obtenida con la composición inmunogénica adyuvantada cuando el (los) componente(s) de adyuvante está(n) a un menor nivel que el que previamente se creía útil y está(n) normalmente como se define en este documento en comparación con el obtenido con composiciones adyuvantadas con algunos adyuvantes de la técnica anterior (es decir, con el (los) mismo(s) componente(s) a un alto nivel).

20 En una realización específica, una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 mejorada puede conferirse por la composición contra la gripe adyuvantada de la presente invención y puede obtenerse idealmente después de una única administración. El enfoque de dosis única será extremadamente relevante, por ejemplo, en una situación de brote que evoluciona rápidamente. En ciertas circunstancias, especialmente para la población anciana, o en el caso de niños jóvenes (menos de 9 años de edad) que se han vacunado por primera vez contra la gripe, o en el caso de una pandemia, puede ser beneficioso administrar dos dosis de la misma composición durante esa estación. La segunda dosis de dicha misma composición (todavía considerada como 'composición para la primera vacunación') puede administrarse durante la respuesta inmunitaria primaria continua y es adecuadamente separada. Normalmente, la segunda dosis de la composición se administra algunas semanas, o aproximadamente un mes, por ejemplo, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, o 6 semanas después de la primera dosis, para ayudar a sensibilizar el sistema inmunitario en individuos resistentes o poco sensibles. En un aspecto específico, la primovacunación va seguida de un ciclo de vacunación posterior de producto de vacuna adyuvantada que contiene una cepa de la gripe heteróloga.

35 En una realización específica, la administración de dicha composición inmunogénica alternativamente o adicionalmente induce una respuesta de linfocitos B de memoria mejorada en pacientes a los que se les administró la composición inmunogénica adyuvantada en comparación con la respuesta de linfocitos B de memoria inducida en individuos inmunizados con la composición sin adyuvante. Una respuesta de linfocitos B de memoria mejorada pretende significar un aumento de la frecuencia de linfocitos B de sangre periférica que pueden diferenciarse en células de plasma secretoras de anticuerpos tras el encuentro con el antígeno como se mide por la estimulación de la diferenciación *in vitro* (véanse las secciones de ejemplos, por ejemplo, procedimientos de linfocitos B de memoria Elispot). En otra realización, la composición inmunogénica adyuvantada, si el (los) componente(s) de adyuvante está(n) a un menor nivel que el que previamente se creía útil y está(n) normalmente como se define anteriormente, es adecuadamente capaz de inducir una respuesta de linfocitos B de memoria contra el o contra al menos uno de los antígenos de componente o composición antigénica comparable (es decir, no significativamente, u opcionalmente estadísticamente significativamente inferior) a la obtenida con composiciones adyuvantadas con algunos adyuvantes de la técnica anterior. Esta característica se denominará en lo sucesivo "respuesta de linfocitos B de memoria comparable" en el texto.

En todavía una realización específica adicional, la vacunación con la composición para la primera vacunación, adyuvantada, no tiene impacto medible sobre la respuesta de CD8.

50 Adecuadamente, la composición reivindicada que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo formulada con un adyuvante de emulsión de aceite en agua de la invención será eficaz en promover respuestas de linfocitos T en una población humana inmunodeprimida o que no ha recibido previamente tratamiento inmunológico. Adecuadamente, la administración de una dosis única de la composición inmunogénica adyuvantada para la primera vacunación, como se describe en la invención, podrá proporcionar mejor seroprotección, como se evalúa por las correlaciones de protección para vacunas contra la gripe, tras la revacunación contra la gripe, con vacunación con una vacuna no adyuvantada contra la gripe. La formulación adyuvantada reivindicada también inducirá ventajosamente una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 mejorada contra el virus de la gripe en comparación con la obtenida con la formulación no adyuvantada. Esta propiedad puede asociarse a un aumento de la receptividad tras la vacunación o infección con respecto a la exposición antigénica a la gripe. Además, esto también puede asociarse a una receptividad cruzada, es decir, una mayor capacidad para responder a cepas de la

gripe variantes. Esta respuesta cualitativamente y/o cuantitativamente mejorada puede ser beneficiosa en todas las poblaciones en el caso de pandemias, y especialmente en una población humana inmunodeprimida tal como la población anciana (65 años de edad y superior) y en particular la población anciana de alto riesgo. Esto también puede ser de beneficio para la mayoría de la población de lactantes sin tratamiento previo (menos de 5 años, adecuadamente menos de 2 años de edad). Si la composición comprende al menos una cepa pandémica, esta respuesta mejorada será beneficiosa para uso para sensibilizar, por ejemplo, de vacuna almacenada que contiene una variante desviada, antes o en la aparición del brote pandémico. Esto puede producir la reducción de la tasa morbilidad y mortalidad global y prevenir ingresos de emergencia en el hospital por neumonía y otras enfermedades similares a la gripe. Además, permite inducir una respuesta de linfocitos T CD4 que es más persistente con el tiempo, por ejemplo, todavía presente un año después de la primera vacunación, en comparación con la respuesta inducida con la formulación no adyuvantada. Todas estas ventajas podrían obtenerse con la composición de adyuvante reivindicada, a la vez que se reduce la reactividad global en comparación con adyuvante que tiene mayor cantidad(es) de componente(s).

Adecuadamente, la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4, tal como la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 "mejorada" o "comparable" obtenida en un sujeto sin sensibilizar, implica la inducción de una respuesta de colaborador T CD4 con reactividad cruzada. En particular, la cantidad de linfocitos T CD4 con reactividad cruzada es elevada. Por respuesta de CD4 'con reactividad cruzada' se indica células T CD4 que eligen como diana epítopes compartidos entre cepas de la gripe, opcionalmente de diferentes subtipos o linajes.

Normalmente, las vacunas contra la gripe disponibles son eficaces sólo contra cepas infectantes del virus de la gripe que tienen hemaglutinina de características antigénicas similares. Si el virus de la gripe infectante (en circulación) ha experimentado cambios menores (tales como una mutación puntual o una acumulación de mutaciones puntuales que producen cambios de aminoácidos en las glucoproteínas de superficie, en particular la hemaglutinina (cepa de virus variante de desviación antigénica), la vacuna puede todavía proporcionar algo de protección, aunque sólo puede proporcionar protección limitada ya que las variantes recientemente creadas pueden escapar de la inmunidad inducida por la infección por la gripe o vacunación previa. La desviación antigénica es responsable de epidemias anuales que se producen durante periodos interpandémicos (Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394). La inducción de linfocitos T CD4 con reactividad cruzada proporciona una ventaja adicional a la composición de la invención, ya que también puede proporcionar protección cruzada, en otras palabras, protección contra infecciones heterólogas, es decir, infecciones producidas por una cepa de la gripe en circulación que es una variante (por ejemplo, una desviación) de la cepa de la gripe contenida en la composición inmunogénica. Esto puede ser ventajoso cuando la cepa en circulación sea difícil de propagar en huevos o de producir en cultivo celular, convirtiéndose el uso de una cepa desviada en una alternativa de trabajo. Esto también puede ser ventajoso cuando el sujeto recibió una primera y una segunda vacunación varios meses o un año atrás, y la cepa de la gripe en la composición inmunogénica usada para una segunda inmunización es una cepa variante desviada de la cepa usada en la composición usada para la primera vacunación.

Por tanto, la composición inmunogénica adyuvantada contra la gripe como se define en este documento tiene una mayor capacidad para inducir seroprotección y linfocitos T CD4 con reactividad cruzada en ancianos vacunados o sujetos de niños jóvenes. Esta característica puede asociarse a una mayor capacidad para responder a una cepa variante de la cepa presente en la composición inmunogénica. Esto puede demostrar que es una ventaja importante en una situación pandémica. Por ejemplo, una composición contra la gripe inmunogénica que comprende al menos una cepa pandémica, opcionalmente cualquiera de las cepas H5, a H2, a H9, H7 o H6, puede proporcionar una mayor capacidad para responder a una variante pandémica, es decir, una cepa desviada de dicha(s) cepa(s) pandémica(s), tanto tras la posterior vacunación con como tras la infección por dicha cepa desviada. Por ejemplo, la composición de vacuna adyuvantada comprende una cepa A/Indonesia y puede generar una respuesta inmunitaria de protección cruzada y/o reactividad cruzada contra una, adecuadamente más de una, de las cepas de desviación, tales como las cepas A/Hong Kong, A/Turquía, A/Vietnam y/o A/Anhui.

Detección de linfocitos T CD4 con reactividad cruzada tras la vacunación con vacuna contra la gripe

Tras la administración de la vacuna contra la gripe trivalente clásica (3 semanas), hay un aumento sustancial en la frecuencia de linfocitos T CD4 de sangre periférica que responden a la preparación de cepa antigénica (virus completo o antígeno fraccionado) que es homóloga a la presente en la vacuna (H3N2: A/Panamá/2007/99, H1N1: A/Nueva Caledonia/20/99, B: B/Shandong/7/97) (véase el Ejemplo III). Un aumento comparable en la frecuencia puede observarse si los linfocitos T CD4 de sangre periférica son reestimulados con cepas de la gripe clasificadas como cepas desviadas (H3N2: A/Sidney/5/97, H1N1: A/Pekín/262/95, B: B/Yamanashi/166/98). A diferencia, si los linfocitos T CD4 de sangre periférica son reestimulados con cepas de la gripe clasificada como cepas desplazadas (H2N2: A/Singapur/1/57, H9N2: A/Hong Kong/1073/99) por el experto en el campo, no hay aumento observable tras la vacunación.

Los linfocitos T CD4 que pueden reconocer cepas de la gripe tanto homólogas como desviadas se han llamado en el presente documento de "reactividad cruzada". Las composiciones contra la gripe adyuvantadas como se describen en este documento han sido capaces de mostrar reactividad cruzada heterosubtípica, ya que hay reactividad cruzada observable contra cepas desviadas de la gripe. Como se ha dicho anteriormente, la capacidad de una formulación de vacuna que comprende al menos una cepa pandémica para ser eficaz contra cepa(s)

desviada(s) pandémica(s) puede demostrar ser una característica importante en el caso de pandemia.

Coherentemente con las observaciones anteriores, se han identificado epítopes de linfocitos T CD4 compartidos por diferentes cepas de la gripe en seres humanos (Gelder C y col. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM y col. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM y col. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).

5 Debido a sus propiedades inmunogénicas, la composición reivindicada puede ser capaz de establecer una estrategia de vacunación proactiva contra la amenaza de una pandemia de la gripe humana, que incluye las reservas de vacuna prepandémica con el fin de prepararse mejor contra la aparición de una pandemia. También puede ser capaz de establecer una estrategia de vacunación proactiva contra cepas en circulación que podrían no coincidir exactamente con la(s) cepa(s) presente(s) en la composición de vacuna. En una realización específica, la
10 composición adyuvantada puede ofrecer el beneficio adicional de proporcionar mejor protección contra cepas en circulación que han experimentado un cambio importante (tal como recombinación de genes, por ejemplo, entre dos especies diferentes) en la hemaglutinina (desplazamiento antigénico) contra las que las vacunas actualmente disponibles no tienen eficacia.

Específicamente, la vacuna prepandémica es una que comprende al menos una cepa pandémica (opcionalmente H5N1 (gripe aviar)) similar a las actualmente en circulación en la población de aves y se ha producido, por ejemplo, mediante el uso de genética inversa. La inmunidad desarrollada en respuesta a la vacuna prepandémica puede permitir que el sistema inmunitario se 'sensibilice' o se 'eduque' para la llegada y así permita un desarrollo más rápido de respuestas inmunitarias protectoras después de encontrar la cepa del virus pandémico real que conduce a una disminución de la susceptibilidad a una cepa pandémica relacionada de la gripe. Una vez la OMS ha declarado una pandemia y se ha identificado la cepa pandémica final (que puede ser o no ser una cepa desviada), la vacuna prepandémica también permitirá una respuesta inmunitaria más rápida a la vacuna pandémica cuando esta última esté disponible.
15
20

Revacunación y composición usada para la revacunación (composición de refuerzo)

En un aspecto se proporciona el uso de:

- 25 (a) un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, de una primera cepa de la gripe, y
- (b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en este documento

en la preparación de una composición inmunogénica como se define en este documento para la protección contra infecciones de la gripe producidas por una cepa de la gripe que es una variante de dicha primera cepa de la gripe.

También se proporciona una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, de una primera cepa de la gripe, y un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en este documento para su uso en la protección de un ser humano o una población humana contra infecciones de la gripe producidas por una cepa de la gripe que es una variante de dicha primera cepa de la gripe.
30

En este documento también se proporciona el uso de un antígeno de la gripe en la preparación de una composición inmunogénica contra la gripe para la revacunación de seres humanos previamente vacunados (con una o dos dosis) con una composición contra la gripe adyuvantada como se define en este documento. También se proporciona una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, opcionalmente con un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en este documento, para su uso en la revacunación de seres humanos previamente vacunados (con una o dos dosis) con una composición contra la gripe adyuvantada como se define en este documento.
35

40 En una realización, la composición inmunogénica para la revacunación contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítopes de linfocitos T CD4 comunes con el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo usada para la primera vacunación. Un epítopo de linfocitos T CD4 común pretende significar péptidos/secuencias/epítopes de diferentes antígenos que pueden ser reconocidos por la misma célula CD4 (véanse los ejemplos de epítopes descritos en: Gelder C y col. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM y col. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM y col. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).
45

En un aspecto se proporciona el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, de una primera cepa de la gripe (opcionalmente una pandémica), en la preparación de una composición inmunogénica adyuvantada como se define en este documento para la protección contra infecciones de la gripe producidas por una cepa de la gripe que es una variante de dicha primera cepa de la gripe (opcionalmente una pandémica). También se proporciona una composición inmunogénica adyuvantada que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, de una primera cepa de la gripe (opcionalmente una pandémica), y un adyuvante como se define en este documento para su uso en la protección contra infecciones de la gripe producidas por una cepa de la gripe que es una variante de dicha primera cepa de la gripe (opcionalmente una pandémica).
50

55 En otro aspecto se proporciona el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo en la preparación de una composición inmunogénica contra la gripe para la revacunación de seres humanos previamente vacunados con una composición contra la gripe adyuvantada como se reivindica en este documento o con una composición

contra la gripe adyuvantada que comprende una cepa variante de la gripe, siendo el adyuvante como se define en este documento. También se proporciona una composición inmunogénica contra la gripe que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, opcionalmente con un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en este documento, para su uso en la revacunación de seres humanos previamente vacunados con una composición contra la gripe adyuvantada como se reivindica en este documento o con una composición contra la gripe adyuvantada que comprende una cepa variante de la gripe, siendo el adyuvante como se define en este documento.

En otro aspecto se desvela un procedimiento de vacunar una población humana o individuo contra una cepa del virus de la gripe, seguido de la revacunación de dicho ser humano o población contra una cepa del virus de la gripe variante, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho ser humano (i) una primera composición que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo de una primera cepa del virus de la gripe y un adyuvante como se define en este documento, y (ii) una segunda composición inmunogénica que comprende una cepa del virus de la gripe variante de dicha primera cepa del virus de la gripe. En una realización específica, dicha primera cepa está asociada a una pandemia o tiene la posibilidad de asociarse a un brote de pandemia. En otra realización específica, dicha cepa variante está asociada a una pandemia o tiene la posibilidad de asociarse a una pandemia. En particular, la revacunación se hace con una composición contra la gripe que comprende al menos una cepa que es una cepa pandémica en circulación. En otra realización, dicha cepa variante es una variante de desviación, opcionalmente de un subtipo próximo o adecuadamente alejado de H3N2 usado como la primera cepa. En otra realización, dicha cepa variante es una cepa B de un linaje diferente al de la primera cepa B (tal como B/Yamagata o B/Victoria, que pertenecen a linajes diferentes). Tanto la composición de sensibilización como la composición de refuerzo pueden ser monovalentes o adecuadamente multivalentes, es decir, pueden contener al menos dos cepas del virus de la gripe, tales como una vacuna bivalente, trivalente, cuadrivalente o pentavalente. Si la(s) composición (composiciones) es (son) multivalente(s), al menos una cepa se selecciona adecuadamente del grupo que consiste en: una cepa pandémica, una cepa B (tal como B/Yamagata o B/Victoria), una cepa H3N2, y es opcionalmente una variante de desviación de la cepa presente en la vacuna usada para la primera vacunación.

La primera vacunación puede comprender adecuadamente dos dosis, administradas en el plazo de algunas semanas durante la misma respuesta inmunitaria continua, como se define anteriormente. Normalmente, la revacunación se hace varios meses después de la primera vacunación, adecuadamente al menos tres meses, o 4 meses después de la primera vacunación, adecuadamente 8 a 14 meses después, adecuadamente de aproximadamente 10 a 12 meses después o incluso después. Adecuadamente, la revacunación se hace al menos 6 meses después de la(s) primera(s) vacunación (vacunaciones). Adecuadamente, la revacunación se hace próxima a o en la siguiente estación de la gripe, por ejemplo, aproximadamente un año después de la primera composición inmunogénica. La composición de refuerzo también puede administrarse en cada uno de los años siguientes (tercera, cuarta, quinta vacunación, etc.).

Por consiguiente, se desvela un esquema de vacunación (o una composición para su uso en dicho esquema) que comprende (i) una vacunación primaria hecha con una composición adyuvantada según la invención, administrada en una o dos dosis (adecuadamente separadas, por ejemplo, separadas 3 a 6 semanas, o separadas 3-4 semanas), en cualquier momento en el año (es decir, fuera de la estación de la gripe), seguido de (ii) una vacunación de refuerzo administrada al menos de 6 semanas a un año después de la primera vacunación. Si se administran dos dosis en la vacunación primaria, la primera puede ser con una vacuna estacional trivalente o cuadrivalente adyuvantada, seguida de una segunda dosis de una vacuna adyuvantada pandémica (por ejemplo, monovalente). Adecuadamente, el refuerzo se administra al menos 6 semanas después de la primera vacunación y en cualquier momento dentro del calendario de inmunización rutinaria (por ejemplo, para niños), o en la siguiente estación de la gripe. La composición de refuerzo puede ser con cualquier vacuna contra la gripe comercialmente autorizada (por ejemplo, una vacuna sin adyuvantar o adyuvantada trivalente clásica tal como FluAd™), o con una composición adyuvantada según la invención (por ejemplo, una composición trivalente o cuadrivalente adyuvantada). Adecuadamente, la composición de refuerzo comprende las cepas estacionales en circulación para esa estación, que pueden ser variante de desviación de las cepas presentes en la vacuna primaria. Este esquema de vacunación es adecuado para la población pediátrica que podría sensibilizarse pronto en la vida (por ejemplo, a una edad de menos de 6 meses, o menos de 2 meses) con la vacuna entonces disponible, y reforzarse con una composición que comprende las cepas en circulación, que pueden ser variante de desviación de las cepas presentes en la composición primaria.

La composición inmunogénica para la revacunación (la composición de refuerzo) puede contener algún tipo de preparación de antígeno, tanto inactivado como atenuado vivo. Puede contener el mismo tipo de preparación de antígeno, por ejemplo, un virus de la gripe fraccionado o preparación antigénica del mismo, un virión completo, o una vacuna de HA y NA purificada (subunidad), como la composición inmunogénica usada para la primera vacunación. La composición de refuerzo puede contener el mismo subtipo de antígeno(s) de la gripe que el usado para la primera vacunación. Por ejemplo, si la primera vacunación se hace en una declaración de una pandemia y la revacunación se hace después, la revacunación se hace con una vacuna que comprende una cepa de la gripe (por ejemplo, H5N1 Vietnam) que es del mismo subtipo que se usó para la primera vacunación (por ejemplo, H5N1 Vietnam). Alternativamente, la composición de refuerzo puede contener una cepa desviada del mismo subtipo de antígeno(s) de la gripe que el usado para la primera vacunación, por ejemplo, H5N1 Indonesia. En otra realización, dicha cepa de la gripe usada para la revacunación es una cepa de desplazamiento, es decir, es diferente de la que

se usó para la primera vacunación, por ejemplo, tiene un subtipo de HA o NA diferente, tal como H5N2 (el mismo subtipo de HA que H5N1, pero diferente subtipo de NA) o H7N1 (subtipo de HA diferente de H5N1, pero el mismo subtipo de NA). Por ejemplo, la composición de vacuna para la primera inmunización comprende una cepa A/Indonesia y la composición de refuerzo comprende cepa(s) A/Hong Kong, A/Turquía, A/Vietnam y/o A/Anhui.

5 En una realización se usa un virus fraccionado. La composición de refuerzo puede estar adyuvantada o no adyuvantada. La composición de refuerzo no adyuvantada puede ser Fluarix™/α-Rix®/Influsplit® administrada intramuscularmente, que contiene tres antígenos de virión fraccionados inactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por la OMS de la estación de la gripe apropiada. En particular, las cepas víricas de la gripe o preparación antigénica de las mismas se seleccionan según el material de referencia distribuido por la Organización mundial de la salud de forma que se adapten a la cepa de la gripe que está en circulación en el año de la revacunación. La composición de refuerzo adyuvantada puede comprender adecuadamente un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en este documento, opcionalmente con un inmunestimulante adicional tal como ligando TLR-4 tal como 3D-MPL o una saponina.

15 Adecuadamente, la revacunación hecha con una composición que comprende un adyuvante como se define en este documento induce cualquiera, adecuadamente dos o todas, de las siguientes: (i) una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ mejorada contra el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, o (ii) una respuesta de linfocitos B de memoria mejorada o (iii) una respuesta humoral mejorada en comparación con la respuesta equivalente inducida después de una primera vacunación con el virus de la gripe no adyuvantado o preparación antigénica del mismo. Adecuadamente, la revacunación hecha con una composición que comprende un adyuvante como se define en este documento induce cualquiera, adecuadamente dos o todas, de las siguientes: (i) una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ comparable al virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, o (ii) una respuesta de linfocitos B de memoria comparable o (iii) una respuesta humoral comparable en comparación con la respuesta equivalente inducida después de una primera vacunación con el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo adyuvantada con un adyuvante en la que los componentes están presentes a un mayor nivel.

25 La revacunación de los sujetos con una composición de refuerzo que comprende un virus de la gripe y un adyuvante de emulsión de aceite en agua de la invención mostrará mayores títulos de anticuerpos que los valores correspondientes en el grupo de personas vacunado primero con la composición no adyuvantada y reforzado con la composición no adyuvantada. El efecto del adyuvante en potenciar la respuesta de anticuerpos a la revacunación es especialmente de importancia en la población anciana o en niños jóvenes que se sabe que tienen una baja respuesta a la vacunación o infección por el virus de la gripe. En particular, el beneficio asociado a la composición adyuvantada también será marcado en términos de mejorar la respuesta de linfocitos T CD4 tras la revacunación.

35 La composición adyuvantada para la revacunación será capaz de inducir una mejor receptividad cruzada contra la cepa desviada (la cepa de la gripe de la siguiente estación de la gripe) en comparación con la protección conferida por la vacuna de control. Dicha receptividad cruzada ha mostrado una mayor persistencia en comparación con la obtenida con la formulación no adyuvantada. El efecto del adyuvante en potenciar la receptividad cruzada contra la cepa desviada es importante en una situación pandémica.

40 También se ha desvelado una pauta de vacunación en la que la primera vacunación se hace con una composición contra la gripe, adecuadamente una composición contra la gripe fraccionada, que contiene una cepa de la gripe que posiblemente podría producir una pandemia y la revacunación se hace con una composición, tanto monovalente como multivalente, que comprende al menos una cepa en circulación, tanto una cepa pandémica como una cepa clásica.

45 En una realización específica, la dosis humana de la composición inmunogénica para la revacunación está adyuvantada con un adyuvante de emulsión de aceite en agua de la invención. Adecuadamente, la HA por cepa por dosis es aproximadamente 15 µg. En una realización específica, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente de aproximadamente 10 µg de HA por cepa por dosis o inferior, de forma que se logre un máximo de 40-45 µg de HA por dosis) y es como se define anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa es aproximadamente o inferior a 5 µg, aproximadamente 2,5 µg o inferior. La dosis humana de la composición inmunogénica para la revacunación comprende adecuadamente un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende la mitad de los componentes presentes en la composición usada para la vacunación primaria. Dicha dosis de revacunación puede administrarse aproximadamente un año o aproximadamente dos años después de la vacunación primaria.

Epítotope de CD4 en HA

55 Esta desviación antigénica reside principalmente en regiones de epítotope de las proteínas de la superficie víricas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se sabe que cualquier diferencia en los epítotope de linfocitos CD4 y B entre diferentes cepas de la gripe, que son usados por el virus para evadir la respuesta adaptiva del sistema inmunitario huésped, desempeñará una función importante en la vacunación contra la gripe.

Se han identificado epítotope de linfocitos T CD4 compartidos por diferentes cepas de la gripe en seres humanos (véase, por ejemplo: Gelder C y col. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM y col. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; y Gelder CM y col. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).

La revacunación puede hacerse usando una composición de refuerzo que contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítopes de linfocitos T CD4 comunes con el antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo usada para la primera vacunación. Se proporciona el uso de la composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe pandémico o preparación antigénica del mismo y un adyuvante de emulsión de aceite en agua de la invención en la preparación de un componente de la primera vacunación de una vacuna multidosis, comprendiendo la vacuna multidosis además, como dosis de refuerzo, un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítopes de linfocitos T CD4 comunes con el antígeno del virus de la gripe pandémico o preparación antigénica del virus del mismo de la dosis administrada en la primera vacunación.

10 Medios de vacunación

La composición de la invención puede administrarse por cualquier vía de administración adecuada tal como intradérmica, mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea. Otras vías de administración son muy conocidas en la técnica.

La vía de administración intramuscular es particularmente adecuada para la composición contra la gripe adyuvantada. La composición según la invención puede presentarse en un recipiente de monodosis, o alternativamente, un recipiente de multidosis, particularmente adecuado para una vacuna pandémica. En este caso, un conservante antimicrobiano tal como tiomersal está normalmente presente para prevenir la contaminación durante el uso. La concentración de tiomersal puede ser de 25 µg/0,5 ml de dosis (es decir, 50 µg/ml). Una concentración de tiomersal de 5 µg/0,5 ml de dosis (es decir, 10 µg/ml) o 10 µg/0,5 ml de dosis (es decir, 20 µg/ml) está adecuadamente presente. Podría usarse un dispositivo de administración IM adecuado tal como un dispositivo de inyección de chorro de líquido sin aguja, por ejemplo, Biojector 2000 (Bioject, Portland, OR). Alternativamente podría usarse un dispositivo de inyector de pluma, tal como se usa para la administración en casa de epinefrina, para permitir la autoadministración de la vacuna. El uso de tales dispositivos de administración puede ser particularmente apto para campañas de inmunización a gran escala tales como serían requeridas durante una pandemia.

La administración intradérmica es otra vía adecuada. Cualquier dispositivo adecuado puede usarse para administración intradérmica, por ejemplo, un dispositivo de aguja corta. Las vacunas intradérmicas también pueden administrarse por dispositivos que limitan la longitud de penetración eficaz de una aguja en la piel, tales como aquellos descritos en los documentos WO99/34850 y EP1092444, y equivalentes funcionales de los mismos. También son adecuados dispositivos de inyección de chorro que administran vacunas líquidas a la dermis por un inyector de chorro líquido o por una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcanza la dermis. También son adecuados dispositivos de administración de polvo/partículas balísticas que usan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo por las capas externas de la piel a la dermis. Adicionalmente pueden usarse jeringuillas convencionales en el método de Mantoux clásico de administración intradérmica.

Otra vía de administración adecuada es la vía subcutánea. Puede usarse cualquier dispositivo adecuado para administración subcutánea, por ejemplo, aguja clásica. Adecuadamente se usa un dispositivo de inyector de chorro sin aguja. Adecuadamente, dicho dispositivo está precargado con la formulación de vacuna líquida.

Alternativamente, la vacuna se administra intranasalmente. Normalmente, la vacuna se administra localmente al área nasofaríngea, adecuadamente sin ser inhalada en los pulmones. Se desea usar un dispositivo de administración intranasal que administre la formulación de vacuna al área nasofaríngea, sin o sustancialmente sin entrar en los pulmones.

Dispositivos adecuados para la administración intranasal de las vacunas según la invención son dispositivos de spray. Dispositivos de spray comercialmente disponibles adecuados incluyen Accuspray™ (Becton Dickinson). Los nebulizadores producen un spray muy fino que puede ser fácilmente inhalado en los pulmones y, por tanto, no alcanza eficazmente la mucosa nasal. Por tanto, no se prefieren los nebulizadores.

Dispositivos de spray adecuados para uso intranasal son dispositivos para los que el rendimiento del dispositivo no depende de la presión aplicada por el usuario. Estos dispositivos se conocen como dispositivos de umbral de presión. El líquido es liberado de la boquilla sólo cuando se aplica una presión umbral. Estos dispositivos hacen más fácil de lograr un spray con un tamaño de gotita regular. Los dispositivos de umbral de presión adecuados para su uso con la presente invención se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos WO91/13281 y EP311863B y EP516636. Tales dispositivos están comercialmente disponibles de Pfeiffer GmbH y también se describen en Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, Sept 1999.

Los dispositivos intranasales adecuados producen gotitas (medidas usando agua como líquido) en el intervalo de 1 a 200 µm, adecuadamente de 10 a 120 µm. Por debajo de 10 µm hay un riesgo de inhalación, por tanto se desea tener no más de aproximadamente el 5% de gotitas inferior a 10 µm. Las gotitas por encima de 120 µm no se extienden tan bien como las gotitas más pequeñas, por lo que se desea tener no más de aproximadamente el 5% de gotitas que supere 120 µm.

La administración de bidosis es otra característica adecuada de un sistema de administración intranasal para su uso

con las vacunas según la invención. Los dispositivos de bidosis contienen dos subdosis de una única dosis de vacuna, una subdosis para administración a cada orificio nasal. Generalmente, las dos subdosis están presentes en una única cámara y la construcción del dispositivo permite la administración eficiente de una única subdosis de una vez. Alternativamente puede usarse un dispositivo de monodosis para administrar las vacunas según la invención.

5 Alternativamente, la vía de vacunación epidérmica o transdérmica también se contempla en la presente invención.

En un aspecto, la composición inmunogénica adyuvantada para la primera administración puede administrarse intramuscularmente, y la composición de refuerzo, tanto adyuvantada como no, puede administrarse por una vía diferente, por ejemplo, intradérmica, subcutánea o intranasal. En una realización específica, la composición para la primera administración contiene una cantidad de HA de menos de 15 µg para la cepa de la gripe pandémica, y la composición de refuerzo puede contener una cantidad estándar de 15 µg o, adecuadamente una baja cantidad de HA, es decir, inferior a 15 µg, que, dependiendo de la vía de administración, puede administrarse en un menor volumen.

Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una dosis única, los componentes de la misma también pueden coadministrarse juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, los antígenos de la gripe podrían administrarse por separado, adecuadamente en el mismo momento que la administración del adyuvante). Además de una única vía de administración, pueden usarse 2 vías de administración diferentes cuando se administran dos inyecciones. Por ejemplo, la primera administración (por ejemplo, dosis de sensibilización) de antígenos de la gripe adyuvantados puede administrarse IM (o ID) y la segunda administración (por ejemplo, dosis de refuerzo) puede administrarse IN (o ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse IM para la dosis de sensibilización e IN para las dosis de refuerzo.

El contenido de antígenos de la gripe en la vacuna estará en el intervalo 0,1-15 µg de HA por cepa de la gripe, adecuadamente 1-10 µg, lo más normalmente en el intervalo 1-8 µg. Un contenido adecuado de antígenos de la gripe será inferior a o exactamente 5 µg de HA por cepa de la gripe incluida en la vacuna. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente separadas.

25 Poblaciones a vacunar

La población diana a vacunar es toda la población, por ejemplo, adultos jóvenes sanos (por ejemplo, 18-50 ó 18-60 años de edad), ancianos (normalmente de más de 60 años) o lactantes/niños. La población diana puede estar en particular inmunodeprimida. Los seres humanos inmunodeprimidos generalmente son menos capaces de responder a un antígeno, en particular a un antígeno de la gripe, en comparación con adultos sanos.

Por ejemplo, la población diana es una población que no está sensibilizada contra la gripe, tanto que no han recibido tratamiento previo (tal como con respecto a una cepa pandémica) como que han fracasado en responder previamente a la infección o vacunación contra la gripe. Adecuadamente, la población diana son personas ancianas adecuadamente de al menos 60 edad, o al menos 65 años y más, adultos de alto riesgo más jóvenes (es decir, entre 18 y 60 años de edad) tal como personas que trabajan en instituciones sanitarias, o aquellos adultos jóvenes con un factor de riesgo tal como enfermedad cardiovascular y pulmonar, o diabetes. Otra población diana es todos los niños desde el nacimiento, o de 2 meses edad y más, o de 6 meses de edad y más, especialmente niños de 6-23 meses de edad que experimentan una tasa de hospitalización relacionada con la gripe relativamente alta. Otra población diana es niños más jóvenes desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad.

Para evitar dudas, las realizaciones en este documento referentes a “composiciones de vacuna” de la invención también son aplicables a realizaciones referentes a “composiciones inmunogénicas” de la invención, y viceversa. El término “aproximadamente” (o alrededor de) en todos los valores numéricos permite una variación del 5%, es decir, un valor de aproximadamente el 1,25% significaría entre 1,19%-1,31%.

La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

45 El **Ejemplo I** describe procedimientos de lectura inmunológica usados en estudios en ratones, hurones, cerdos y seres humanos.

El **Ejemplo II** describe la preparación de las formulaciones de emulsión de aceite en agua y de adyuvante usadas en los estudios ejemplificados.

El **Ejemplo III** muestra un ensayo clínico en una población adulta de 18-59 años de edad con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe fraccionado y dos dosis de adyuvante AS03.

50 El **Ejemplo IV** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra la gripe fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones BALB/c sensibilizados.

El **Ejemplo V** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra la gripe fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones C57Bl/6 sensibilizados.

55 El **Ejemplo VI** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra la gripe fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno de dosis baja) en ratones C57Bl/6 sensibilizados.

El **Ejemplo VII** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra H5N1 fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 sin

tratamiento previo.

El **Ejemplo VIII** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra la gripe adyuvantadas y no adyuvantadas en cerdos Large White sensibilizados

5 El **Ejemplo IX** muestra una evaluación preclínica de vacunas estacionales TIV y QIV fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo y sensibilizados,

El **Ejemplo X** muestra un ensayo clínico en una población adulta de 18-64 años de edad con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe fraccionado y diversas dosis de adyuvante AS03.

10 El **Ejemplo XI** muestra un ensayo clínico en una población anciana de + 65 años de edad con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe fraccionado y diversos adyuvantes.

Ejemplo I - Procedimientos de lectura inmunológica

I.1. Procedimientos en ratones

I.1.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación

Principio de la prueba (procedimiento clásico).

15 Los títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina para las tres cepas del virus de la gripe (estacionales) se determinan usando la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). El principio de la prueba de HI se basa en la capacidad de anticuerpos contra la gripe específicos para inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos (RBC) por la hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Los sueros inactivados con calor se tratan por caolín y RBC para eliminar inhibidores no
20 específicos. Después del pretratamiento, las diluciones dobles de sueros se incuban con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de la gripe. Luego se añaden glóbulos rojos y la inhibición de la aglutinación se puntúa. Los títulos se expresan como el recíproco de la mayor dilución de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Como la primera dilución de sueros es 1:20, un nivel indetectable se puntúa como un título igual a 10.

Adaptación para H5N1 (descripción específica de HI usando eritrocitos de caballo):

25 Como se documentó que el ensayo de HI clásico para determinar anticuerpos anti-HA no funcionaba bien para la cepa H5N1, se usó un protocolo adaptado usando RBC de caballo. Se usan eritrocitos de caballos para las cepas H5N1 pandémicas. 0,5% (concentración final) de suspensión de glóbulos rojos de caballo en fosfato tampón que contenía 0,5% de BSA (albúmina de suero bovino, concentración final). Esta suspensión se prepara cada día lavando glóbulo rojo con el mismo tampón fosfato y una etapa de centrifugación posterior (10 min, 2000 rpm). Esta
30 etapa de lavado tiene que repetirse una vez. Después de la adición de los glóbulos rojos de caballo a la mezcla de reacción de sueros y suspensión de virus; las placas tienen que incubarse a temperatura ambiente (TA, 20°C +/- 2°C) durante dos horas debido a la baja velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos de caballo.

Análisis estadístico

35 Los análisis estadísticos se realizaron en títulos de HI después de la vacunación usando UNISTAT. El protocolo aplicado al análisis de la varianza puede describirse brevemente del siguiente modo:

- ◆ Transformación logarítmica de datos.
- ◆ Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de la distribución de grupos.
- ◆ Prueba de Cochran con el fin de verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
- 40 ◆ Análisis de la varianza en datos seleccionados.
- ◆ Prueba de interacción de ANOVA bilateral.
- ◆ Prueba de Tukey-HSD de múltiples comparaciones.

I.1.2. Tinción intracelular de citocinas

45 Esta técnica permite una cuantificación de linfocitos T específicos de antígeno basándose en la producción de citocinas: linfocitos T efectores y/o linfocitos T de memoria efectores producen IFN- γ y/o los linfocitos T de memoria central producen IL-2. Las PBMC se recogen en el día 7 después de la inmunización.

Las células linfoides son reestimuladas *in vitro* en presencia de inhibidor de la secreción (brefeldina).

50 Entonces, estas células se procesan por procedimiento inmunofluorescente convencional usando anticuerpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN- γ y IL-2). Los resultados se expresan como una frecuencia de célula positiva para citocinas dentro de los linfocitos T CD4/CD8. La tinción intracelular de citocinas de linfocitos T se realizó en PBMC 7 días después de la segunda inmunización. Se recogió sangre de ratones y se reunieron en medio heparinizado RPMI+ Add. Para la sangre, RPMI + suspensiones de PBL diluidas con Add se estratificaron sobre un gradiente de Lympholyte-Mammal según el protocolo recomendado (centrifugar 20 min a 2500 rpm y TA). Las células

mononucleares en la interfase se eliminaron, se lavaron 2x en RPMI + Add y las suspensiones de PBMC se ajustaron a 2×10^6 células/ml en RPMI-5% de suero bovino fetal.

La estimulación de antígenos *in vitro* de PBMC se llevó a cabo a una concentración final de 1×10^7 células/ml (tubo FACS) con FI completo (1 µg de HA/cepa) y luego se incubó 2 h a 37°C con la adición de anti-CD28 y anti-CD49d (1 µg/ml para ambos).

Tras la etapa de reestimulación de antígeno, las PBMC se incuban durante la noche a 37°C en presencia de brefeldina (1 µg/ml) a 37°C para inhibir la secreción de citocinas.

La tinción de IFN-γ/IL-2/CD4/CD8 se realizó del siguiente modo: las suspensiones de células se lavaron, se resuspendieron en 50 µl de PBS con 1% de SBF que contenía 2% de reactivo de bloqueo de Fc (1/50; 2.4G2). Después de 10 min de incubación a 4°C se añadieron 50 µl de una mezcla de anti-CD4-PE (2/50) y anti-CD8 perCp (3/50) y se incubó 30 min a 4°C. Después de un lavado en PBS con 1% de SBF, las células se permeabilizaron resuspendiendo en 200 µl de Citofix-Citoperm (kit BD) y se incubaron 20 min a 4°C. Entonces, las células se lavaron con Perm Wash (kit BD) y se resuspendieron con 50 µl de una mezcla de anti IFN-γ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) diluido en Perm Wash. Después de una incubación de mín. 2 h máx durante la noche a 4°C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en PBS con 1% de SBF + 1% de paraformaldehído. El análisis de las muestras se realizó por FACS. Las células vivas se separaron (FSC/SSC) y la adquisición se realizó en - 20.000 acontecimientos (linfocitos) o 35.000 acontecimientos en linfocitos T CD4+. El porcentajes de IFN-γ+ o IL2+ se calculó en poblaciones separadas de CD4+ y CD8+.

I.1.3. ELISA anti-H5N1

La cuantificación de títulos de anticuerpos Ig, IgG1 y IgG2b contra H5N1 se realizó por ELISA usando H5N1 fraccionado como recubrimiento. Las disoluciones de virus y de anticuerpo se usaron a 100 µl por pocillo. El virus fraccionado H5N1 se diluyó a una concentración final de 1 µg/ml en PBS y se adsorbió durante la noche a 4°C a los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb Immunoplate Nunc 439454). Entonces, las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C con 200 µl por pocillo de PBS que contenía 1% de BSA y 0,1% de Tween 20 (tampón de saturación). Se añadieron veinte diluciones dobles de sueros en tampón de saturación a las placas recubiertas con H5N1 y se incubaron durante 1 h 30 a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS con 0,1% de Tween 20. El anticuerpo dirigido contra Ig de ratón conjugada biotinilada (Prozan-E0413) diluido 1/500 o el anticuerpo dirigido contra IgG1 de ratón conjugada biotinilada (Imtech 1070-08), o un anticuerpo dirigido contra IgG2b de ratón biotinilada (Imtech 1090-08) diluido 1/4000 en PBS con 1% de BSA, 0,1% de Tween 20 se añadió a cada pocillo y se incubó durante 1,30 horas a 37°C; después de una etapa de lavado, las placas se incubaron 30 min con un conjugado de estreptavidina-biotina-peroxidasa (Prozan P0397) diluido 1/10000 en PBS con 1% de BSA-Tween 20.

Para la revelación colorimétrica, las placas se incubaron 20 min a 22°C con una disolución de o-fenildiamina (Sigma P4664) al 0,04%, H₂O₂, al 0,03% en tampón citrato 0,1 M a pH 4,2. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N y las microplacas se leyeron a 490-630 nm.

I.2. Procedimientos en hurones

I.2.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI)

Procedimiento de prueba.

Los títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina para las tres cepas del virus de la gripe se determinaron usando la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). El principio de la prueba de HI se basa en la capacidad de anticuerpos contra la gripe específicos para inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) por la hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Los sueros se trataron primero con una disolución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron por calor para eliminar inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, las diluciones dobles de sueros se incubaron con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de la gripe. Luego se añadieron los glóbulos rojos de pollo y se puntuó la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la mayor dilución de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Como la primera dilución de sueros fue 1:10, un nivel indetectable se puntuó como un título igual a 5.

Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron en títulos de HI (Día 41, antes de la exposición) usando UNISTAT. El protocolo aplicado al análisis de la varianza puede describirse brevemente del siguiente modo:

- Transformación logarítmica de datos.
- Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de grupos distribución.
- Prueba de Cochran con el fin de verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).

- Prueba de interacción de ANOVA unilateral.
- Prueba de Tukey-HSD de múltiples comparaciones.

1.2.2. Monitorización de la temperatura corporal

5 Las temperaturas individuales se monitorizaron durante el periodo de exposición a los transmisores y por el registro de telemetría. Todos los implantes se comprobaron y se restauraron y se realizó una nueva calibración por DSI (Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, Los Países Bajos) antes de la colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales se alojaron individualmente en jaulas individuales durante estas mediciones.

10 Las temperaturas se registraron cada 15 minutos 4 días antes de la exposición hasta 7 días después de la exposición.

1.2.3. Lavados nasales

Los lavados nasales se realizaron por administración de 5 ml de PBS en ambos orificios nasales en animales despiertos. El inóculo se recogió en una placa de Petri y se colocó en recipientes de muestra sobre nieve carbónica.

Valoración vírica en lavados nasales

15 Todas las muestras nasales se esterilizaron primero por filtración a través de filtros Spin X (Costar) para eliminar cualquier contaminación bacteriana. 50 µl de diluciones seriadas diez veces de lavados nasales se transfirieron a placas de microtitulación que contenían 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). Luego se añadieron 100 µl de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C durante 5-7 días.

20 Después de 5-7 días de incubación, el medio de cultivo se extrajo suavemente y se añadieron 100 µl de un medio que contenía 1/20 de WST-1 y se incubó durante otras 18 h.

25 La intensidad del colorante de formazán amarillo producido tras la reducción de WST-1 por células viables es proporcional al número de células viables presentes en el pocillo al final del ensayo de valoración vírica y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada pocillo a la longitud de onda apropiada (450 nanómetros). El corte se define como la DO promedio de células de control sin infectar - 0,3 DO (0,3 DO se corresponde con +/- 3 DE de la DO de células de control sin infectar). Una puntuación positiva se define cuando DO es < corte y a diferencia una puntuación negativa se define cuando DO es > corte. Los títulos de propagación vírica se determinaron por "Reed y Muench" y se expresaron como log TCID₅₀/ml.

1.3. Procedimientos en cerdos

1.3.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI)

30 *Procedimiento de prueba.*

Los títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina para las tres cepas del virus de la gripe se determinaron usando la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). El principio de la prueba de HI se basa en la capacidad de anticuerpos contra la gripe específicos para inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) por la hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Los sueros se trataron primero con una disolución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron por calor para eliminar inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, las diluciones dobles de sueros se incubaron con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de la gripe. Luego se añadieron los glóbulos rojos de pollo y se puntuó la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la mayor dilución de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Como la primera dilución de sueros fue 1:10, un nivel indetectable se puntuó como un título igual a 5.

40 *Análisis estadístico.*

Los análisis estadísticos se realizaron en títulos de HI (Día 41, antes de la exposición) usando UNISTAT. El protocolo aplicado al análisis de la varianza puede describirse brevemente del siguiente modo:

- Transformación logarítmica de datos.
- 45 ■ Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de la distribución de grupos.
- Prueba de Cochran con el fin de verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
- Prueba de interacción de ANOVA unilateral.
- Prueba de Tukey-HSD de múltiples comparaciones.

50 **1.4. Ensayos para evaluar la respuesta inmunitaria en seres humanos**

1.4.1. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

La respuesta inmunitaria se determinó midiendo anticuerpos de HI usando el procedimiento descrito por el Centro de colaboración con la OMS para la gripe, Centros para el control de enfermedad, Atlanta, EE.UU. (1991).

5 Las mediciones de títulos de anticuerpos se realizaron en muestras de suero congeladas con un microprocedimiento normalizado y exhaustivamente validado usando 4 unidades inhibitoras de la hemaglutinación (4 UIH) de los antígenos apropiados y una suspensión de 0,5% de eritrocitos de ave. Los inhibidores de suero no específicos se eliminaron por tratamiento térmico y enzima destructora de receptores.

10 Los sueros obtenidos se evaluaron para niveles de anticuerpos de HI. Empezando con una dilución inicial de 1:10 se preparó una serie de dilución (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480. El punto final de la valoración se tomó como la mayor etapa de dilución que mostró inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

1.4.2. Ensayo de inhibición de la neuraminidasa

15 El ensayo se realizó en placas de microtitulación recubiertas con fetuina. Se preparó una serie de dilución doble del antisuero y se mezcló con una cantidad normalizada del virus de la gripe A H3N2, H1N1 o de la gripe B. La prueba se basó en la actividad biológica de la neuraminidasa que libera enzimáticamente ácido neuramínico de fetuina. Después de la escisión del ácido neuramínico terminal, la β -D-galactosa-N-acetil-galactosamina se descubrió. A los pocillos se añadió aglutinina de cacahuete marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) de *Arachis hypogaea*, que se une específicamente a las estructuras de galactosa. La cantidad de aglutinina unida puede detectarse y cuantificarse en una reacción en sustrato con tetrametilbencidina (TMB). La mayor dilución de anticuerpos que todavía inhibe la actividad de la neuraminidasa vírica al menos el 50% se indicó como el título de NI.

20 1.4.3. Ensayo de anticuerpos neutralizantes

25 Las mediciones de anticuerpos neutralizantes se realizaron en muestras de suero congeladas descongeladas. La neutralización de virus por anticuerpos contenidos en el suero se determinó en un ensayo de microneutralización. Los sueros se usaron sin tratamiento adicional en el ensayo. Cada suero se probó por triplicado. Una cantidad de virus normalizada se mezcló con diluciones seriadas de suero y se incubó para permitir la unión de los anticuerpos al virus. Luego se añadió una suspensión de células que contenía una cantidad definida de células MDCK a la mezcla de virus y antisuero y se incubó a 33°C. Después del periodo de incubación, la replicación del virus se visualizó por hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo. El título de neutralización al 50% de un suero se calculó mediante el procedimiento de Reed y Muench.

1.4.4. La inmunidad mediada por célula se evaluó por citometría de flujo de citocinas (CFC)

30 Los linfocitos T CD4 y CD8 específicos de antígeno de sangre periférica pueden reestimarse *in vitro* para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa y IFN si se incuban con su correspondiente antígeno. Por consiguiente, los linfocitos T CD4 y CD8 específicos de antígeno pueden enumerarse por citometría de flujo tras el marcado por inmunofluorescencia convencional de fenotipo celular, además de la producción intracelular de citocinas. En el presente estudio se usaron el antígeno de la vacuna contra la gripe, además de péptidos derivados de proteína de la gripe específica, como antígeno para reestimar los linfocitos T específicos de la gripe. Los resultados se expresaron como una frecuencia de linfocito T CD4 o CD8 positivo para citocina(s) dentro de la subpoblación de linfocitos T CD4 o CD8.

1.4.5. Procedimientos estadísticos

1.4.5.1. Criterios de valoración primarios

- 40
- Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales esperados durante un periodo de seguimiento de 7 días (es decir, día de la vacunación y 6 días posteriores) después de la vacunación y global.
 - Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales inesperados durante un periodo de seguimiento de 21 días (es decir, día de la vacunación y 20 días posteriores) después de la vacunación y global.
- 45
- Aparición de acontecimientos adversos graves durante el estudio completo.

1.4.5.2. Criterios de valoración secundarios

Para la respuesta inmunitaria humoral:

VARIABLES OBSERVADAS:

- 50
- En los días 0 y 21: inhibición de la hemaglutinación del suero (HI) y títulos de anticuerpos de NI, probados por separado contra cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).
 - En los días 0 y 21: títulos de anticuerpos neutralizantes, probados por separado contra cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna

Variables derivadas (con intervalos de confianza del 95%):

- Títulos medios geométricos (GMT) de anticuerpos de HI en suero con intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) antes y después de la vacunación
- Tasas de seroconversión* con IC del 95% en el día 21
- 5 • Factores de conversión** con IC del 95% en el día 21
- Tasas de seroprotección*** con IC del 95% en el día 21
- GMT de anticuerpos de NI en suero (con intervalos de confianza del 95%) en todos los momentos de tiempo.

* Tasa de seroconversión definida como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de cuatro veces en los títulos de HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

10 **Factor de conversión definido como el aumento en veces en GMT de HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

***Tasa de protección definida como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero =40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) que normalmente es aceptado como que indica protección.

15 Debe entenderse que, para algunos de los ensayos clínicos, la reactogenicidad/seguridad pueden ser criterios de valoración secundarios, y la inmunogenicidad puede ser el criterio de valoración primario.

Para la respuesta inmune mediada por célula (CMI)

Variable observada

En los días 0 y 21: frecuencia de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 en pruebas diferentes. Cada prueba cuantifica la respuesta de linfocito T CD4/CD8 a:

- 20 • Antígeno de péptido de la gripe (pf) (la naturaleza y el origen precisos de estos antígenos necesita facilitarse/explicarse)
- Antígeno de la gripe fraccionado (sf)
- Antígeno de la gripe completo (wf).

Variables derivadas:

- 25 • células que producen al menos dos citocinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)
- células que producen al menos CD40L y otra citocina (IL-2, TNF α , IFN γ)
- células que producen al menos IL-2 y otra citocina (CD40L, TNF α , IFN γ)
- células que producen al menos IFN γ y otra citocina (IL-2, TNF α , CD40L)
- células que producen al menos TNF α y otra citocina (IL-2, CD40L, IFN γ)

30 *1.3.5.3. Análisis de inmunogenicidad*

El análisis de inmunogenicidad se basó en la cohorte vacunada total. Para cada uno grupo de tratamiento se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de confianza del 95%):

- Títulos medios geométricos (GMT) de HI y títulos de anticuerpos de NI en los días 0 y 21
- Títulos medios geométricos (GMT) de títulos de anticuerpos neutralizantes en los días 0 y 21.
- 35 • Factores de conversión en el día 21.
- Tasas de seroconversión (SC) en el día 21 definidas como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de cuatro veces en los títulos de HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0.
- Tasas de protección en el día 21 definidas como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero =1:40.
- 40 • Se resumió la frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta (estadística descriptiva) para cada grupo de vacunación, en cada momento de tiempo (Día 0, Día 21) y para cada antígeno (de la gripe de péptido (pf), de la gripe fraccionado (sf) y de la gripe completo (wf)).
- Estadística descriptiva en diferencia individual entre respuestas de momento de tiempo (después de-antes de) para cada uno grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf, y wf) en cada una de las 5 pruebas diferentes.
- 45 • Se usó una prueba no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis) para comparar las diferencias de localización entre los 3 grupos y se calculó el valor de p estadístico para cada antígeno en cada una de las 5 pruebas diferentes. Todas las pruebas de significancia fueron bilaterales. Los valores de p inferiores a o iguales a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

50 **Ejemplo II - Preparación de las formulaciones de emulsión de aceite en agua y de adyuvante**

A menos que se establezca de otro modo, la emulsión de aceite/agua usada en los ejemplos posteriores está

compuesta por una fase orgánica constituida por 2 aceites (alfa-tocoferol y escualeno) y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80™ o Polisorbato 80™ como agente emulsionante. A menos que se establezca de otro modo, las formulaciones de adyuvante de emulsión de aceite en agua usadas en los ejemplos posteriores se prepararon comprendiendo cada una el siguiente componente de emulsión de aceite en agua (concentraciones finales dadas):
 5 2,5% de escualeno (volumen/volumen), 2,5% de alfa-tocoferol (volumen/volumen), 0,9% de monooleato de polioxietilensorbitano (volumen/volumen) (Tween 80), véase el documento WO 95/17210. Esta emulsión, llamada AS03 en los ejemplos posteriores, se preparó de la siguiente forma como un concentrado doble.

II.1. Preparación de la emulsión SB62

Este procedimiento se usó en los estudios informados en las secciones de ejemplos clínicos y preclínicos. La preparación de la emulsión SB62 se hace mezclando con fuerte agitación una fase de aceite compuesta por componentes hidrófobos (DL- α -tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua (el detergente aniónico Tween 80 y PBS mod (modificado), pH 6,8). Mientras se agita, la fase aceitosa (1/10 del volumen total) se transfiere a la fase acuosa (9/10 del volumen total), y la mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. Entonces, la mezcla resultante se somete a fuerzas de cizallamiento, impacto y cavitación en la cámara de interacción de un microfluidizador (15000 PSI - 8 ciclos, o 3 ciclos en el adyuvante usado en el ensayo clínico informado en el Ejemplo III) para producir gotitas submicrométricas (distribución entre 100 y 200 nm). El pH resultante está entre $6,8 \pm 0,1$. Entonces, la emulsión SB62 se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 μ m y la emulsión a granel estéril se almacena refrigerada en recipientes Cupac a 2 a 8°C. Se lava con gas inerte estéril (nitrógeno o argón) en el volumen muerto del recipiente a granel final de la emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

La composición final de la emulsión SB62 es del siguiente modo:

Tween 80: 1,8% (volumen/volumen) 19,4 mg/ml; escualeno: 5% (volumen/volumen) 42,8 mg/ml; α -tocoferol: 5% (volumen/volumen) 47,5 mg/ml; PBS-mod: NaCl 121 mM, KCl 2,38 mM, Na₂HPO₄ 7,14 mM, KH₂PO₄ 1,3 mM; pH $6,8 \pm 0,1$.

25 Ejemplo III - Ensayo clínico en una población adulta de 18-59 años de edad con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe fraccionado y dos dosis de adyuvante AS03 (Flu-LD-004)

III.1. Introducción

Se realizó un estudio de simple ciego aleatorizado controlado de fase II en una población adulta de 18-59 años de edad en 2006 con el fin de evaluar la inmunogenicidad, seguridad y reactogenicidad de la vacuna candidata contra la gripe de dosis baja de GlaxoSmithKline Biologicals (es decir, que contiene 5 μ g de HA por cepa) con dos dosis de adyuvante AS03.

La respuesta inmunitaria humoral (es decir, anti-hemaglutinina) se midió 21 días después de la administración intramuscular de una dosis de una vacuna adyuvantada con AS03. Fluarix™ se usó como referencia.

III.2. Diseño del estudio

35 Tres grupos de sujetos recibieron en paralelo la siguiente vacuna intramuscularmente:

- un grupo de 100 sujetos que recibe una inyección de la vacuna contra la gripe de virus fraccionado de dosis baja que contiene 5 μ g de HA adyuvantada con AS03 (FluLD1/1)
- un grupo de 100 sujetos que recibe una inyección de la vacuna contra la gripe de virus fraccionado de dosis baja que contiene 5 μ g de HA adyuvantada con media dosis de AS03 (AS03 1/2) (FluLD1/2)
- 40 ■ un grupo de 100 sujetos que recibe una dosis de Fluarix™ (Fluarix)

Programa: una inyección IM de vacuna contra la gripe en el día 0, visitas al sitio de estudio en el día 0 y día 21 con una recogida de muestra de sangre (determinación de anticuerpos de HI) y un contacto telefónico adicional en el día 30 (conclusión del estudio).

45 La vacuna contra la gripe fraccionada trivalente convencional Fluarix™ usada en este estudio es una vacuna comercial del hemisferio norte del año 2006/2007 desarrollada y fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals.

III.3. Objetivos del estudio

III.3.1. Objetivo primario

- Evaluar la respuesta inmunitaria humoral inducida por las vacunas del estudio en términos de títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina:

50 *Variabes observadas en los días 0 y 21:* títulos de anticuerpos de la inhibición de la hemaglutinación en suero.

Variabes derivadas (con intervalos de confianza del 95%):

- Títulos medios geométricos (GMT) de anticuerpos en suero en los días 0 y 21
- Tasas de seroconversión* en el día 21
- Factores de seroconversión** en el día 21
- Tasas de seroprotección*** en los días 0 y 21

5 * La tasa de seroconversión para la respuesta de anticuerpos de hemaglutinina se define como el porcentaje de vacunados que tienen tanto un título antes de la vacunación $< 1:10$ como un título después de la vacunación $\geq 1:40$ o un título antes de la vacunación $\geq 1:10$ y al menos un aumento de cuatro veces en el título después de la vacunación

10 ** Factor de seroconversión definido como el aumento en veces en GMT de HI en suero después de la vacunación en comparación con el día 0

*** Tasa de seroprotección definida como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero $\geq 1:40$ después de la vacunación que normalmente es aceptado como que indica protección.

III.3.2. Objetivo secundario

15 - Evaluar la seguridad y reactogenicidad de las vacunas del estudio en términos de acontecimientos adversos locales y generales esperados, acontecimientos adversos inesperados y acontecimientos adversos graves:

1. Aparición, intensidad y relación con la vacunación de signos locales y generales esperados y síntomas durante un periodo de seguimiento de 7 días (es decir, día de la vacunación y 6 días posteriores) después de cada vacunación en cada grupo.
- 20 2. Aparición, intensidad y relación con la vacunación de signos locales y generales inesperados y síntomas durante un periodo de seguimiento de 30 días (es decir, día de la vacunación y 29 días posteriores) después de la vacunación en cada grupo.
3. Aparición y relación de acontecimientos adversos graves durante el periodo de estudio completo en cada grupo.

III.4. Composición y administración de vacunas

25 III.4.1. Preparación de vacunas

La vacuna contra la gripe no adyuvantada es una vacuna contra la gripe inactivada de virión fraccionado trivalente que consiste en tres vacunas de antígeno vírico monovalente (preparadas respectivamente a partir de las cepas de la gripe A/H1N1, A/H3N2 y B). Los antígenos presentes en esta vacuna son los mismos que en la vacuna *Fluarix*[™] autorizada que está disponible en el mercado como *Fluarix*[™] (α -Rix®) desde 1992 y contiene 15 μ g de HA/cepa por dosis. Las cepas de la gripe incluidas en los lotes clínicos de FluLD son las cepas que se eligieron para el hemisferio norte en 2006/2007:

- Cepa similar a A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1): A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116
- Cepa similar a A/Wisconsin/67/2005 (H3N2): A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) NYMCX-161
- B/Malasia/2506/2004.

35 Los antígenos se derivan de virus cultivados en huevos. El fraccionamiento se lleva a cabo con desoxicolato de sodio antes de la etapa de inactivación, que se realiza mediante la posterior acción de desoxicolato de sodio y formaldehído.

La vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 (FluLD) (lotes clínicos) se basa en la vacuna *Fluarix*[™] (comercialmente disponible preparada respectivamente a partir de las cepas de la gripe A/H1N1, A/H3N2 y B), pero con un menor contenido de antígeno y adyuvantada con el sistema de adyuvante de GSK AS03. AS03 consiste en una emulsión de aceite en agua (SB62) que contiene dos aceites biodegradables, escualeno y α -tocoferol (vitamina E), y un tensioactivo, polisorbato 80 (Tween 80). Los antígenos de la gripe se incorporan en la fase acuosa del sistema de adyuvante por simple mezcla con la emulsión. Se han probado dos formulaciones, que se diferencian por la cantidad de adyuvante introducida con los antígenos de la gripe en el lote de vacuna. Las vacunas adyuvantadas contienen 5 μ g de hemaglutinina (HA) de cada cepa del virus de la gripe por dosis, combinada con una dosis completa (AS03) o media dosis (AS03 1/2) del sistema de adyuvante AS03. Los excipientes son los siguientes: polisorbato 80 (Tween 80), octoxinol 10 (Triton X-100), hidrogenosuccinato de alfa-tocoferilo, cloruro sódico, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de potasio, agua para inyección. Las vacunas contra la gripe de dosis baja adyuvantadas con AS03 (FluLD, dosis completa o media dosis de AS03) son vacunas libres de conservante. Sin embargo, contienen cantidades traza de tiomersal ($< 1,25 \mu$ g de Hg por dosis) de las fases tempranas del procedimiento de fabricación. Ambas se presentan como vacunas de monodosis en jeringuillas precargadas de vidrio (tipo I) a un volumen de 0,5 ml/dosis.

III.4.1.1. Composición de vacuna contra la gripe adyuvantada con AS03

55 Una dosis de FluLD (dosis completa o media dosis de AS03) se corresponde con 0,5 ml. La composición se proporciona en la Tabla 3. El contenido de HA por dosis es 5 μ g para ambas formulaciones, siendo la única

diferencia la cantidad de AS03 presente en los recipientes finales.

Tabla 3 Composición de vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 (dosis completa y media dosis de AS03)

| Componente | Cantidad por dosis (0,5 ml) |
|---|-----------------------------|
| Viriones fraccionados inactivados | |
| - A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116 | 5 µg de HA |
| - A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) NYMCX-161 | 5 µg de HA |
| - B/Malasia/2506/2004 | 5 µg de HA |
| <u>Adyuvante (dosis completa / media dosis)</u> | |
| - Emulsión SB62 (volumen total) | 0,250 ml |
| • Escualeno | 10,70 mg / 5,35 mg |
| • DL- α -tocoferol | 11,88 mg / 5,94 mg |
| • Polisorbato 80 (Tween 80) | 4,85 mg / 2,425 mg |
| Polisorbato 80 (Tween 80) | 0,122 mg |
| Octoxinol 10 (Triton X-100) | 0,0283 mg |
| Hidrogenosuccinato de α -tocoferilo | 0,01665 mg |
| Cloruro sódico | 4 mg |
| Fosfato de disodio | 0,575 mg |
| Hidrogenofosfato de potasio | 0,100 mg |
| Cloruro de potasio | 0,101 mg |
| Agua para inyección | hasta 0,50 ml |
| Abreviaturas: HA = Hemaglutinina. | |
| El contenido total en Polisorbato 80 se corresponde con 4,972 mg por dosis cuando se usa la dosis completa de AS03, y 2,547 mg por dosis cuando se usa media dosis de AS03. | |

5 III.4.1.2. Producción de preparación de antígeno de la gripe inactivado fraccionado

Los antígenos de la gripe son idénticos a los incluidos en *Fluarix*TM (vacuna contra el virus de la gripe). Las vacunas monovalentes consisten en virus fraccionados inactivados purificados que se preparan a partir de semillas de trabajo de las tres cepas del virus de la gripe, tipo A (H1N1 y H3N2) y tipo B, que se cultivan individualmente en huevos de gallina embrionados. Estas semillas de trabajo se derivan de cepas que se recibieron de un centro colaborador con la OMS siguiendo las recomendaciones de la OMS anuales. Para el procedimiento para preparar los antígenos se hace referencia a modo de ilustración al documento WO 02/097072. Los volúmenes de las tres vacunas monovalentes se basan en el contenido de HA medido en cada vacuna monovalente antes de la formulación y en el volumen de fabricación diana.

15 Una solución salina tamponada con fosfato concentrada 10 veces (pH 7,4 cuando se concentra 1 vez) y una premezcla de Tween 80 e hidrogenosuccinato de α -tocoferilo se diluyen en agua para inyección, seguido de agitación durante 5-30 minutos a temperatura ambiente.

ES 2 377 761 T3

Entonces, las tres vacunas monovalentes concentradas se diluyen sucesivamente en la disolución resultante de solución salina tamponada con fosfato / Tween 80 - hidrogenosuccinato de α -tocoferilo a una concentración de

20 μ g de HA de cada vacuna monovalente de A (H1N1, H3N2)
23,32 μ g de HA de la vacuna monovalente de B

- 5 por ml de vacuna trivalente intermedia (5 μ g de HA de cada vacuna monovalente de A y 5,83 μ g de HA de B / 500 μ l de vacuna final trivalente).

Entre las adiciones de cada vacuna monovalente, la mezcla se agita durante 10 - 30 minutos a temperatura ambiente y durante 15 - 30 minutos después de la adición de la última vacuna monovalente. Esta vacuna trivalente intermedia también denominada en lo sucesivo "pre-mezcla" puede mantenerse a +2 - +8°C o adicionalmente procesarse a la etapa de formulación final en el mismo día. El volumen final del pre-mezcla es 250 μ l por dosis.

III.4.1.3. Preparación de las composiciones de vacuna con adyuvante AS03

Vacuna adyuvantada: LD AS03 1/1 (Tabla 4)

15 PBS mod concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando se concentra una vez; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4), además de una mezcla que contiene Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades teniendo en cuenta el detergente presente en las cepas), se añaden a agua para inyección. Después de 5 a 30 minutos de agitación, 20 μ g de HA por ml de cada cepa H1N1 y H3N2 y 23,32 μ g de HA por ml de cepa B se añaden con 10 a 30 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 a 30 minutos de agitación, un pequeño volumen de la llamada "vacuna intermedia" se desecha para análisis y se guarda entre +2 y +8°C. La vacuna intermedia está en PBS mod concentrado 1 vez. La concentración de detergente diana son 488 μ g de Tween 80 por ml, 73,6 μ g de Triton X-100 por ml y 66,6 μ g de VES por ml.

Entonces se prepara la formulación final: un volumen igual de SB62 (véase la preparación en el Ejemplo II) se añade a cada 250 μ l de vacuna intermedia de pre-mezcla y se mezcla durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. El pH se comprueba para que oscile entre 6,8 y 7,5. La formulación se lava con nitrógeno y luego se guarda entre +2 y 8°C antes de envasarse.

25 **Tabla 4 Vacuna de dosis baja adyuvantada con AS03**

| Componente | Concentración | Volumen (ml) |
|---|-------------------------------|-------------------------|
| Etapa 1: Pre-mezcla | | |
| Vacuna monovalente de A/Nueva Caledonia | 104 μ g/ml | 302,88 |
| Vacuna monovalente de A/Wisconsin | 85 μ g/ml | 370,59 |
| Vacuna monovalente de B/Malasia | 110 μ g/ml | 333,90 |
| PBS mod(1) | Véase la nota a pie de página | 56,76 |
| Tween 80 | 48000 μ g/ml | 5,24 |
| Triton X-100 | | Residuo de la cepa H3N2 |
| Hidrogenosuccinato de α -tocoferilo | 26480 μ g/ml | 1,2 |
| Agua filtrada | | 504,43 |
| Volúmenes totales = 1575 (ml) | | |
| <i>Se recuperan 75 ml de muestras de pre-mezcla para las pruebas</i> | | |
| <u>Volumen de pre-mezcla restante = 1500 (ml)</u> | | |
| Etapa 2: Añadido a pre-mezcla | | |
| Emulsión | | 1500 |
| Volúmenes totales de vacuna final = 3000 (ml) | | |
| (1): La composición a granel final del tampón es: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, pH 7,4 | | |

Vacuna adyuvantada: LD AS03 1/2 (Tabla 5)

- 5 PBS mod concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando se concentra una vez – véase la composición anterior), además de una mezcla que contiene Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades teniendo en cuenta el detergente presente en las cepas), se añaden a agua para inyección. Después de 5 a 30 minutos de agitación, 20 µg de HA por ml de cada cepa H1N1 y H3N2 y 23,32 µg de HA por ml de cepa B se añaden con 10 a 30 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 a 30 minutos de agitación, un pequeño volumen de la llamada “vacuna intermedia” se desecha para análisis y se guarda entre +2 y +8°C. PBS mod se concentra 1 vez en la vacuna intermedia. La concentración de detergente diana son 488 µg de Tween 80 por ml, 73,6 µg de Triton X-100 por ml y 66,6 µg de VES por ml.
- 10 Entonces se prepara la formulación final: SB62 se diluye primero con el tampón PBS mod y se agita durante 15 - 30 minutos a TA. Luego se añade un volumen igual de esta SB62 diluido a cada 250 µl de pre-mezcla de vacuna intermedia. Después de 30 a 60 minutos de agitación a TA, el pH se comprueba para que oscile entre 6,8 y 7,5. La formulación se lava con nitrógeno y luego se guarda entre +2 y 8°C antes de envasarse.
- 15 El volumen final de ambas formulaciones es 500 µl por dosis y la concentración de HA final es 10 µg de cada vacuna monovalente de A y 11,66 µg de la vacuna monovalente de B por ml de vacuna final trivalente. Las concentraciones diana finales de Tween 80, Triton X-100 (residuo de la fabricación de la vacuna monovalente H3N2) e hidrogenosuccinato de α-tocoferilo (el hidrogenosuccinato de α-tocoferilo es una forma de éster de RRR(isómero D)-α-tocoferol) son 244 µg/ml, 58,6 µg/ml y 33,3 µg/ml, respectivamente.

Tabla 5 Vacuna de dosis baja adyuvantada con AS03 (media dosis de adyuvante)

| Componente | Concentración | Volumen (ml) |
|---|------------------|-------------------------|
| Etapa 1: Pre-mezcla | | |
| Etapa 1: Pre-mezcla | | |
| Vacuna monovalente de A/Nueva Caledonia | 104 µg/ml | 300,96 |
| Vacuna monovalente de A/Wisconsin | 85 µg/ml | 368,24 |
| Vacuna monovalente de B/Malasia | 110 µg/ml | 331,78 |
| PBS mod(1) | Véase la leyenda | 56,4 |
| Tween 80 | 48000 µg/ml | 5,2 |
| Triton X-100 | | Residuo de la cepa H3N2 |
| Hidrogenosuccinato de α-tocoferilo | 26480 µg/ml | 1,2 |
| Agua filtrada | | 501,22 |
| Volúmenes totales = 1565 (ml) | | |
| <i>Se recuperan 65 ml de pre-mezcla para las pruebas</i> | | |
| Volumen de pre-mezcla restante = 1500 (ml) | | |
| Etapa 2: Añadido a pre-mezcla | | |
| Emulsión SB62 | | 750 |
| PBS mod(1) | Véase la leyenda | 75 |
| Agua filtrada | | 675 |
| Volúmenes totales de vacuna final = 3000 (ml) | | |
| (1): La composición a granel final del tampón es: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, pH 7,4 | | |

20 III.4.2. Administración de vacunas

La vacuna se envasa en jeringuillas de vidrio de tipo I estériles de 1,25 ml (Ph. Eur.). Cada jeringuilla está cargada a un objetivo de 0,57 ml (intervalo: 0,54-0,60 ml). Las vacunas se administraron intramuscularmente en la región

deltoide del brazo no dominante. Todas las vacunas estuvieron presentes como jeringuillas precargadas (0,5 ml). Con el fin de garantizar la apropiada inyección IM de la vacuna se usó una aguja de al menos 25G y al menos 2,5 cm de longitud.

III.5 Resultados de las poblaciones en estudio

- 5 Un total de 300 sujetos se enrolaron en este estudio: 100 sujetos en cada uno de los 3 grupos. La edad media de la cohorte vacunada total en el momento de la vacunación fue 36,7 años con una desviación estándar de 13,67 años. La edad media y la distribución por sexo de los sujetos a través de los 3 grupos de vacuna fueron similares.

III.6 Resultados de inmunogenicidad

El análisis de inmunogenicidad se realizó en la cohorte de ATP para inmunogenicidad (297 sujetos).

10 Respuesta inmunitaria humoral

Con el fin de evaluar la respuesta inmunitaria humoral inducida por la vacuna candidata contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de confianza del 95%) para cada grupo de tratamiento:

- Títulos medios geométricos (GMT) de títulos de anticuerpos de HI en los días 0 y 21;
 - Tasas de seroconversión (SC) en los días 21;
 - Factores de conversión en el día 21;
 - Tasas de protección en el día 0 y 21.
- 15

III.6.1 HI Títulos medios geométricos (GMT)

20 Los GMT para anticuerpos de HI con IC del 95% se muestran en la Tabla 6 y la Figura 1. Las relaciones de GMT ajustadas entre grupos se muestran en la Tabla 7.

25 Los GMT antes de la vacunación de anticuerpos de HI para las 3 cepas de vacuna estuvieron dentro del mismo intervalo en los 3 grupos de tratamiento. Los GMT observados en el día 21 para grupos adyuvantados tienden a ser mayores que en el grupo de Fluarix para las 3 cepas con una diferencia estadística (sin solapamiento del IC del 95% y la relación de GMT ajustada no contuvo el valor 1) entre FluLD1/1 y Fluarix para la cepa de la vacuna A/Wisconsin. Una diferencia estadística (la relación de GMT ajustada no contuvo el valor 1) también se observó entre FluLD1/2 y Fluarix para la cepa de la vacuna B/Malasia.

Tabla 6 - Tasas de seropositividad y títulos medios geométricos (GMT) para anticuerpo anti-HA en el día 0 y 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

| Anticuerpo | Grupo | Momento | N | ≥ 10 1/DIL | | | | GMT | | | Mín | Máx |
|-------------------|----------|----------|----|------------|------|------------|------|-------|------------|-------|-------|--------|
| | | | | n | % | IC del 95% | | 1/DL | IC del 95% | | | |
| | | | | | | LI | LS | | LI | LS | | |
| A/Nueva Caledonia | FluLD1/1 | PRE | 99 | 80 | 80,8 | 71,7 | 88,0 | 31,9 | 23,5 | 43,4 | <10,0 | 2560,0 |
| | | PI (D21) | 99 | 99 | 100 | 96,3 | 100 | 475,4 | 352,2 | 641,6 | 20,0 | 7240,0 |
| | FluLD1/2 | PRE | 99 | 80 | 80,8 | 71,7 | 88,0 | 36,1 | 26,9 | 48,5 | <10,0 | 3620,0 |
| | | PI (D21) | 99 | 98 | 99,0 | 94,5 | 100 | 399,0 | 294,7 | 540,2 | <10,0 | 7240,0 |
| | Fluarix | PRE | 98 | 85 | 86,7 | 78,4 | 92,7 | 26,1 | 20,5 | 33,2 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 98 | 98 | 100 | 96,3 | 100 | 380,6 | 274,2 | 528,4 | 10,0 | 7240,0 |
| A/Wisconsin | FluLD1/1 | PRE | 99 | 61 | 61,6 | 51,3 | 71,2 | 16,8 | 13,1 | 21,5 | <10,0 | 453,0 |
| | | PI (D21) | 99 | 99 | 100 | 96,3 | 100 | 276,2 | 223,5 | 341,3 | 28,0 | 5120,0 |
| | FluLD1/2 | PRE | 99 | 66 | 66,7 | 56,5 | 75,8 | 19,9 | 15,2 | 25,9 | <10,0 | 640,0 |
| | | PI (D21) | 99 | 99 | 100 | 96,3 | 100 | 241,9 | 192,9 | 303,4 | 20,0 | 5120,0 |
| | Fluarix | PRE | 98 | 58 | 59,2 | 48,8 | 69,0 | 14,7 | 11,6 | 18,6 | <10,0 | 320,0 |
| | | PI (D21) | 98 | 97 | 99,0 | 94,4 | 100 | 172,3 | 136,4 | 217,6 | <10,0 | 5120,0 |

ES 2 377 761 T3

(continuación)

| | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------|----------|----|----|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|
| B/Malasia | FluLD1/1 | PRE | 99 | 72 | 72,7 | 62,9 | 81,2 | 20,4 | 15,9 | 26,1 | <10,0 | 453,0 |
| | | PI (D21) | 99 | 99 | 100 | 96,3 | 100 | 268,6 | 221,3 | 326,0 | 28,0 | 2560,0 |
| | FluLD1/2 PRE | PRE | 99 | 76 | 76,8 | 67,2 | 84,7 | 22,2 | 17,6 | 27,9 | <10,0 | 320,0 |
| | | PI (D21) | 99 | 99 | 100 | 96,3 | 100 | 301,5 | 246,1 | 369,4 | 28,0 | 3620,0 |
| | Fluarix | PRE | 98 | 76 | 77,6 | 68,0 | 85,4 | 26,5 | 20,9 | 33,6 | <10,0 | 320,0 |
| | | PI (D21) | 98 | 97 | 99,0 | 94,4 | 100 | 219,2 | 171,4 | 280,2 | <10,0 | 5120,0 |

FluLD1/1 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con dosis completa de adyuvante AS03

FluLD1/2 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con media dosis de adyuvante AS03

Fluarix = Vacuna Fluarix

GMT = Título de anticuerpos medio geométrico

N = Número de sujetos con resultados disponibles

n/% = Número/porcentaje de sujetos seropositivos (título de HI \geq 1:10)

IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior

Mín/Máx = Mínimo/Máximo

PRE = Antes de la vacunación en el día 0

PI (D21) = Después de la vacunación en el día 21

TABLA 7 - Relaciones de GMT ajustadas entre grupos para cada cepa de vacuna en el día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

| Anticuerpo | Descripción del grupo | N | GMT ajustado | Descripción del grupo | N | GMT ajustado | Relación de orden de relación | Valor | | IC del 95% | |
|--|-----------------------|----|--------------|-----------------------|----|--------------|-------------------------------|-------|-------------------------------|------------|----|
| | | | | | | | | Valor | Relación de orden de relación | LI | LS |
| A/Nueva Caledonia (1/DIL) | FluLD1/1 | 99 | 472,4 | FluLD1/2 | 99 | 385,0 | FluLD1/1 | 1,23 | 0,80 | 1,88 | |
| | FluLD1/1 | 99 | 472,3 | Fluarix | 98 | 396,9 | /FluLD1/2 | 1,19 | 0,78 | 1,82 | |
| | FluLD1/2 | 99 | 385,0 | Fluarix | 98 | 397,0 | FluLD1/2 / Fluarix | 0,97 | 0,63 | 1,49 | |
| A/Wisconsin (1/DIL) | FluLD1/1 | 99 | 277,3 | FluLD1/2 | 99 | 230,0 | FluLD1/1 | 1,21 | 0,90 | 1,62 | |
| | FluLD1/1 | 99 | 277,5 | Fluarix | 98 | 180,8 | /FluLD1/2 | 1,54 | 1,14 | 2,06 | |
| | FluLD1/2 | 99 | 230,0 | Fluarix | 98 | 180,6 | FluLD1/2 / Fluarix | 1,27 | 0,95 | 1,71 | |
| B/Malasia (1/DIL) | FluLD1/1 | 99 | 275,1 | FluLD1/2 | 99 | 303,4 | FluLD1/1 | 0,91 | 0,68 | 1,22 | |
| | FluLD1/1 | 99 | 275,2 | Fluarix | 98 | 212,7 | /FluLD1/2 | 1,29 | 0,96 | 1,74 | |
| | FluLD1/2 | 99 | 303,4 | Fluarix | 98 | 212,6 | FluLD1/2 / Fluarix | 1,43 | 1,06 | 1,92 | |

FluLD1/1 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con dosis completa de adyuvante AS03
 FluLD1/2 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con media dosis de adyuvante AS03
 Fluarix = Vacuna Fluarix
 GMT ajustado = título de anticuerpos medio geométrico ajustado para título inicial
 N = Número de sujetos con resultados disponibles tanto antes como después de la vacunación
 IC del 95% = Intervalo de confianza del 95% para la relación de GMT ajustada (modelo de Ancova: ajuste para título inicial – varianza del conjunto con más de 2 grupos); LI = Límite inferior, LS = Límite superior

III.6.2 Factores de seroconversión de títulos de anticuerpos anti-HI, tasas de seroprotección y tasas de seroconversión (establece una correlación con la protección como se establece para la vacuna contra la gripe en seres humanos)

5 Los resultados se presentan en la Tabla 8 - Figura 2 para tasas de seroprotección, Tabla 9 - Figura 3 para tasas de seroconversión y Tabla 10 - Figura 4 para factores de conversión.

El umbral requerido por las autoridades europeas para las tasas de seroprotección (70%) se alcanzó en todos los grupos (al menos el 94,9%). Para cada cepa de vacuna, las tasas de seroprotección en el día 21 para los 3 grupos estuvieron dentro del mismo intervalo.

10 El umbral requerido por las autoridades europeas para las tasas de seroconversión (40%) se alcanzó en todos los grupos (al menos el 65%).

Para la cepa de la vacuna A/Nueva Caledonia, las SCR en el día 21 para los 3 grupos estuvieron dentro del mismo intervalo.

15 Para la cepa de la vacuna A/Wisconsin, la SCR en el día 21 para el grupo de FluLD1/1 tendió a ser mayor en comparación con el grupo de Fluarix. La SCR en el día 21 para el grupo de FluLD1/2 estuvo dentro del mismo intervalo en comparación con el grupo de Fluarix.

Para la cepa de vacuna B/Malasia, la SCR en el día 21 para el grupo de FluLD1/2 tendió a ser mayor en comparación con el grupo de Fluarix. La SCR en el día 21 para el grupo de FluLD1/1 estuvo dentro del mismo intervalo en comparación con el grupo de Fluarix.

20 El umbral requerido por las autoridades europeas para los factores de seroconversión (2,5) se alcanzó en todos los grupos (al menos 6,2).

Para the cepa de la vacuna A/Nueva Caledonia, el SCF en el día 21 para los 3 grupos pareció estar dentro del mismo intervalo. El valor observado para el grupo de FluLD1/2 fue inferior al valor observado para el grupo de Fluarix, pero pudo explicarse por la mayor tasa de seroprotección antes de la vacunación en el grupo de FluLD1/2.

25 Para la cepa de la vacuna A/Wisconsin, el SCF en el día 21 para el grupo de FluLD1/1 tendió a ser mayor en comparación con el grupo de Fluarix. El SCF en el día 21 para el grupo de FluLD1/2 estuvo dentro del mismo intervalo en comparación con el grupo de Fluarix.

Para la cepa de vacuna B/Malasia, el SCF en el día 21 para los dos grupos adyuvantados tendió a ser mayor en comparación con el grupo de Fluarix.

30 **TABLA 8 - Tasas de seroprotección (SPR) para título de anticuerpos de HI en el día 0 y día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)**

| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | SPR | | | |
|-------------------|----------|----------|----|-----|------|------------|------|
| | | | | n | % | IC del 95% | |
| | | | | | | LI | LS |
| A/Nueva Caledonia | FluLD1/1 | PRE | 99 | 41 | 41,4 | 31,6 | 51,8 |
| | | PI (D21) | 99 | 95 | 96,0 | 90,0 | 98,9 |
| | FluLD1/2 | PRE | 99 | 55 | 55,6 | 45,2 | 65,5 |
| | | PI (D21) | 99 | 97 | 98,0 | 92,9 | 99,8 |
| | Fluarix | PRE | 98 | 35 | 35,7 | 26,3 | 46,0 |
| | | PI (D21) | 98 | 93 | 94,9 | 88,5 | 98,3 |

(continuación)

| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | SPR | | | |
|--------------------|----------|----------|----|-----|------|------------|------|
| | | | | n | % | IC del 95% | |
| | | | | | | LI | LS |
| A/Wisconsin | FluLD1/1 | PRE | 99 | 32 | 32,3 | 23,3 | 42,5 |
| | | PI (D21) | 99 | 97 | 98,0 | 92,9 | 99,8 |
| | FluLD1/2 | PRE | 99 | 37 | 37,4 | 27,9 | 47,7 |
| | | PI (D21) | 99 | 97 | 98,0 | 92,9 | 99,8 |
| | Fluarix | PRE | 98 | 25 | 25,5 | 17,2 | 35,3 |
| | | PI (D21) | 98 | 93 | 94,9 | 88,5 | 98,3 |
| B/Malasia | FluLD1/1 | PRE | 99 | 31 | 31,3 | 22,4 | 41,4 |
| | | PI (D21) | 99 | 97 | 98,0 | 92,9 | 99,8 |
| | FluLD1/2 | PRE | 99 | 39 | 39,4 | 29,7 | 49,7 |
| | | PI (D21) | 99 | 98 | 99,0 | 94,5 | 100 |
| | Fluarix | PRE | 98 | 44 | 44,9 | 34,8 | 55,3 |
| | | PI (D21) | 98 | 94 | 95,9 | 89,9 | 98,9 |

FluLD1/1 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con dosis completa de adyuvante AS03

FluLD1/2 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con media dosis de adyuvante AS03

Fluarix = Vacuna Fluarix

N = Número de sujetos con resultados disponibles

n/% = Número/porcentaje de sujetos seroprotectidos (título de HI \geq 40 1/DIL)

IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior

PRE = Antes de la vacunación en el día 0

PI (D1) = Después de la vacunación en el día 21

Fuente de datos = Tabla IIIA del apéndice

TABLA 9 - Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpos de HI en el día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

| Cepa de la vacuna | Grupo | N | SCR | | | |
|--------------------------|----------|----|-----|------|------------|------|
| | | | n | % | IC del 95% | |
| | | | | | LI | LS |
| A/Nueva Caledonia | FluLD1/1 | 99 | 69 | 69,7 | 59,6 | 78,5 |
| | FluLD1/2 | 99 | 64 | 64,6 | 54,4 | 74,0 |
| | Fluarix | 98 | 66 | 67,3 | 57,1 | 76,5 |
| A/Wisconsin | FluLD1/1 | 99 | 88 | 88,9 | 81,0 | 94,3 |
| | FluLD1/2 | 99 | 79 | 79,8 | 70,5 | 87,2 |
| | Fluarix | 98 | 73 | 74,5 | 64,7 | 82,8 |

(continuación)

| | | | | | | |
|--|----------|----|----|------|------|------|
| B/Malasia | FluLD1/1 | 99 | 76 | 76,8 | 67,2 | 84,7 |
| | FluLD1/2 | 99 | 82 | 82,8 | 73,9 | 89,7 |
| | Fluarix | 98 | 65 | 66,3 | 56,1 | 75,6 |
| <p>FluLD1/1 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con dosis completa de adyuvante AS03</p> <p>FluLD1/2 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con media dosis de adyuvante AS03</p> <p>Fluarix = Vacuna Fluarix</p> <p>Seroconversión definida como:</p> <p>Para sujetos inicialmente seronegativos, título de anticuerpos ≥ 40 1/DIL después de la vacunación</p> <p>Para sujetos inicialmente seropositivos, título de anticuerpos después de la vacunación ≥ 4 veces el título de anticuerpos antes de la vacunación</p> <p>N = Número de sujetos con resultados disponibles antes y después de la vacunación</p> <p>n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos</p> <p>IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior</p> | | | | | | |

TABLA 10 - Factor de seroconversión (SCF) para título de anticuerpos de HI en el día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

| Cepa de la vacuna | Grupo | N | SCF | | |
|--|----------|----|-------|------------|------|
| | | | Valor | IC del 95% | |
| | | | | LI | LS |
| A/Nueva Caledonia | FluLD1/1 | 99 | 14,9 | 10,4 | 21,3 |
| | FluLD1/2 | 99 | 11,0 | 7,7 | 15,9 |
| | Fluarix | 98 | 14,6 | 9,9 | 21,6 |
| A/Wisconsin | FluLD1/1 | 99 | 16,5 | 13,0 | 20,9 |
| | FluLD1/2 | 99 | 12,2 | 9,2 | 16,1 |
| | Fluarix | 98 | 11,7 | 8,8 | 15,6 |
| B/Malasia | FluLD1/1 | 99 | 13,2 | 10,0 | 17,4 |
| | FluLD1/2 | 99 | 13,6 | 10,2 | 18,0 |
| | Fluarix | 98 | 8,3 | 6,2 | 11,0 |
| <p>FluLD1/1 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con dosis completa de adyuvante AS03</p> <p>FluLD1/2 = Vacuna contra la gripe de dosis baja (5 ug de HA/cepa) con media dosis de adyuvante AS03</p> <p>Fluarix = Vacuna Fluarix</p> <p>N = Número de sujetos con resultados disponibles antes y después de la vacunación</p> <p>SCF = Factor de seroconversión o relación media geométrica ($\text{media}[\log_{10}(\text{PI (D21)/PRE})]$)</p> <p>IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior</p> | | | | | |

III.7 Conclusiones de seguridad

5 Una mayor reactogenicidad en términos de síntomas esperados (locales/generales) e inesperados en los grupos de vacuna adyuvantada en comparación con el grupo de Fluarix fue la tendencia global observada en este estudio. Una reducción del contenido de AS03 en la vacuna adyuvantada tiene un impacto significativo sobre todos los síntomas de grado 3 generales y locales.

La aparición de síntomas inesperados tendió a ser mayor en los grupos de vacuna adyuvantada (55% y 47% de sujetos) en comparación con el grupo de Fluarix (35%).

De estos resultados puede concluirse que la perfil de reactogenicidad y de seguridad de las vacunas candidatas es satisfactorio y clínicamente aceptable.

10 **III.8. Conclusiones globales**

III.8.1. Resultados de inmunogenicidad

El objetivo primario de este estudio fue evaluar la respuesta inmunitaria humoral (títulos de anticuerpos anti-HI) provocada por la vacuna contra la gripe de dosis baja con dos concentraciones de adyuvante AS03 diferentes, y por Fluarix.

15 En el día 21, las tres vacunas sobrepasaron los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de vacunas contra la gripe de virión fraccionado (“Nota orientativa para la armonización de requisitos para vacunas contra la gripe” para la evaluación inmunológica de los cambios de cepas anuales -CPMP/BWP/214/96). Los GMT tendieron a ser mayores en los grupos adyuvantados en comparación con el grupo de Fluarix, con una diferencia estadísticamente significativa observada para las cepas de la vacuna A/Wisconsin (FluLD1/1 frente a Fluarix) y B/Malasia (FluLD1/2 frente a Fluarix). Se observaron tasas de seroprotección similares en los tres grupos de vacuna que oscilan del 94,9% al 99%. Se observó que las tasas de seroconversión y los factores de seroconversión eran mayores en los grupos adyuvantados que en el grupo de Fluarix. Los datos de este ensayo también revelaron que la inmunogenicidad inducida por la vacuna con media dosificación de adyuvante AS03 era comparable a la inducida con la dosis completa de adyuvante.

25 III.8.2. Resultados de reactogenicidad y de seguridad

La administración del vacuna candidata contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 fue segura y clínicamente bien tolerada en la población en estudio, es decir, personas adultas de edades entre 18 y 59 años. La vacuna adyuvantada de media dosis mostró una marcada disminución en la incidencia de síntomas locales y generales esperados en comparación con la vacuna adyuvantada de dosis completa.

30 **Ejemplo IV - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones BALB/c sensibilizados**

IV.1. Diseño experimental y objetivo

35 Los experimentos en ratones sensibilizados a la gripe se realizaron con el fin de evaluar el aumento en las respuestas humorales por AS03 inducidas por vacunas contra la gripe formuladas con este adyuvante de aceite en agua. Para estar próximo a la situación humana (las personas son seropositivas debido a una infección repetida con cepas desviadas aproximadamente cada dos años), este experimento se realizó usando animales que fueron sensibilizados con cepas heterosubtípicas. La sensibilización heterosubtípica también es un modelo más riguroso en comparación con la sensibilización con cepas homotípicas y es un mejor modelo para discriminar entre diferentes adyuvantes.

40 IV.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 11)

45 Grupos de 27 ratones BALB/c hembra adultos se sensibilizaron intranasalmente (20 µl de volumen) en el día 0 con virus de la gripe inactivado con formalina completo trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de sensibilización consistieron en variantes de desviación anteriores (5 µg de HA para H1N1 A/Johannesburgo/82/96, H3N2 A/Sidney/5/97, B/Harbin/7/94 inactivadas completas) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones se vacunaron con una dosis única del candidato a vacuna intramuscularmente en un volumen total de 50 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados solos (simples fraccionados trivalentes) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados adyuvantados con dos dosis de AS03 (completa o 1/5). Las cepas usadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos víricos de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99, B/Shandong/7/97 (1,5 µg/cepa, 1/10 de la dosis humana).

50

Tabla 11

| Gr | Antígeno / formulación | Otro tratamiento |
|----|--|-------------------------------|
| 1 | Fraccionado trivalente / simple (no adyuvantada) | Sensibilización heteróloga D0 |
| 2 | Fraccionado trivalente / AS03 | Sensibilización heteróloga D0 |
| 3 | Fraccionado trivalente / AS03 1/5 | Sensibilización heteróloga D0 |

IV.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

5 Una premezcla de Tween 80, Triton X100 y succinato de vitamina E (VES) se prepara con el fin de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades usadas en la premezcla se calculan teniendo en cuenta las cantidades de detergente y VES ya presentes en las cepas.

10 Preparación de un litro de tampón de solución salina concentrado 10 veces (PBS a pH 7,4): a 0,800 l de agua para inyección, añadir NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 11,44 g, KH₂PO₄ 2 g. Después de la solubilización, ajustar a 1,0 l con agua para inyección. El pH será 7,4 cuando se diluya 10 veces.

Fraccionada trivalente / simple

15 La formulación de una dosis de 50 µl se prepara extemporáneamente según la secuencia: agua para inyección + tampón de solución salina (PBS concentrado 10 veces a pH 7,4) + premezcla, 5 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA para la cepa H1N1, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA para la cepa H3N2, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA de la cepa B, 15 min de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectan dentro de la hora siguiente al fin de su preparación.

Fraccionada trivalente /AS03

20 Una premezcla de Tween 80, Triton X100 y succinato de vitamina E (VES) se prepara con el fin de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades usadas en la premezcla se calculan teniendo en cuenta las cantidades de detergente y VES ya presentes en las cepas.

25 La formulación de una dosis de 50 µl se prepara extemporáneamente según la secuencia: agua para inyección + tampón de solución salina (PBS concentrado 10 veces a pH 7,4) + premezcla, 5 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA para la cepa H1N1, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA para la cepa H3N2, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA de la cepa B, 15 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis completa de AS03 o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 de dosis de AS03, 15 min de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectan dentro de la hora siguiente al fin de su preparación.

30 IV.1.3. Lecturas (Tabla 12)

La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió antes de la inmunización (día 28) y 14 días después de la inmunización (27 ratones/grupo). Las muestras de suero se probaron por la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI).

Tabla 12

| Lectura | Momento de tiempo | Tipo de muestra | Procedimiento de análisis |
|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| Respuesta humoral | D28, D42 | Sueros | IHA |

35

IV.2. Resultados

IV.2.1. Inmunidad humoral

40 Los resultados se presentan en la Figura 5. En este modelo de ratón de sensibilización heterosubtípica seguida de una única vacunación se mostró que AS03 y diluciones del mismo inducían mayores títulos de HI en comparación con la vacuna simple. Para todas las cepas de la gripe A se observó un aumento estadísticamente significativo de títulos de HI ($p < 0,05$). Para la cepa H1N1 también se observó una diferencia significativa en títulos de HI entre AS03 y AS03 1/5 ($p < 0,05$). Una dosis reducida de AS03 fracasó en aumentar los títulos de HI para la cepa B en

comparación con la vacuna simple. Se observaron respuestas muy bajas contra la cepa B (B/Shandong); esto es probablemente debido a la significativa desviación antigénica entre la cepa B usada para la sensibilización y la vacuna.

IV.3. Resumen de resultados y conclusiones

- 5 En conclusión, se observó un aumento en títulos de HI en animales sensibilizados con cepas heterosubtípicas cuando se usaron vacunas adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna simple. Una dosis completa de AS03 fue óptima para obtener títulos de HI robustos contra las tres cepas de la vacuna contra la gripe.

Ejemplo V - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones C57Bl/6 sensibilizados

10 V.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones sensibilizados a la gripe se realizaron con el fin de evaluar el aumento en respuestas humorales y celulares por AS03 inducidas por vacunas contra la gripe formuladas con este adyuvante de aceite en agua.

- 15 Para simular la situación humana se realizó un experimento usando ratones sensibilizados con cepas heterosubtípicas.

V.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 13)

- 20 Grupos de 25 ratones C57Bl/6 hembra adultos se sensibilizaron intranasalmente (20 µl de volumen) en el día 0 con virus de la gripe inactivado con formalina completo trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de sensibilización consistieron en variantes de desviación anteriores (5 µg de HA para H1N1 A/Pekín/262/95, H3N2 A/Panamá/2007/99, B/Shandong/7/97 inactivadas completas) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones se vacunaron con una dosis única del candidato a vacuna intramuscularmente en un volumen total de 100 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados solos (simples fraccionados trivalentes) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados adyuvantados con tres dosis de AS03 (completa, 1/2 o 1/5). Las cepas usadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos víricos de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (1,5 µg/cepa, 1/10 de la dosis humana).
- 25

Tabla 13

| Gr | Antígeno / formulación | Otro tratamiento |
|----|--|-------------------------------|
| 1 | Fraccionado trivalente / simple (no adyuvantada) | Sensibilización heteróloga D0 |
| 2 | Fraccionado trivalente / AS03 | Sensibilización heteróloga D0 |
| 3 | Fraccionado trivalente / AS03 1/2 | Sensibilización heteróloga D0 |
| 4 | Fraccionado trivalente / AS03 1/5 | Sensibilización heteróloga D0 |
| 5 | PBS | Sensibilización heteróloga D0 |

V.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Fraccionada trivalente / simple

- 30 Las formulaciones para una dosis de 100 µl se preparan extemporáneamente según la secuencia: agua para inyección + tampón de solución salina (PBS concentrado 10 veces a pH 7,4 preparado como se enseña en el Ejemplo IV) + lote de Fluarix DFLUA014 (1,5 µg por cepa en la dosis final).

Fraccionada trivalente /AS03

- 35 Las formulaciones para una dosis de 100 µl se preparan extemporáneamente según la secuencia: agua para inyección + tampón de solución salina (PBS concentrado 10 veces a pH 7,4 preparado como se enseña en el Ejemplo IV) + lote de Fluarix DFLUA014 (1,5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis completa o 12,5 µl de emulsión SB62 para la mitad de la dosis o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 de la dosis. Las formulaciones se inyectan dentro de la hora siguiente al fin de la preparación.

V.1.3. Lecturas (Tabla 14)

- 40 La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) y las muestras de suero se probaron por la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). La respuesta inmunitaria

celular (15 ratones por grupo) se probó 7 días después de la inmunización por tinción intracelular de citocinas (ICS).

Tabla 14

| Momento de tiempo de la lectura | Tipo de muestra | Procedimiento de análisis |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------|
| Respuesta humoral D49 | Sueros | IHA |
| Respuesta celular D35 | PBMC | ICS |

V.2. Resultados

5 V.2.1. Inmunidad humoral (10 ratones/grupo).

Los resultados se presentan en la Figura 6. En este modelo de ratón de sensibilización heterosubtípica seguido de una única vacunación se mostró que AS03 y diluciones (1/2 y 1/5) del mismo inducían mayores títulos de HI en comparación con la vacuna simple. Para las tres cepas no se observó diferencia de títulos de HI entre ratones que recibieron la vacuna adyuvantada con una dosis completa de AS03 o dosis reducida de AS03.

10 V.2.2. Inmunidad celular (15 ratones/grupo).

Los resultados se presentan en la Figura 7. Independientemente de la dilución de AS03, se observaron mayores respuestas de linfocitos T CD4+ en ratones inmunizados con vacuna fraccionada trivalente adyuvantada con AS03 en comparación con ratones inmunizados con simple fraccionada trivalente. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con fraccionada trivalente adyuvantada con una dosis completa de AS03 se observó una tendencia a reducir las respuestas celulares cuando los ratones se inmunizaron con fraccionada trivalente adyuvantada con menores dosis de AS03.

V.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un aumento en las respuestas humorales y celulares en animales sensibilizados con cepas heterosubtípicas cuando se usaron vacunas adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna simple. Se observó una magnitud similar de la respuesta humoral entre ratones inmunizados con dosis completa o dosis fraccionaria de adyuvante AS03. Sin embargo, una reducción en la dosis de adyuvante se asoció a una tendencia a magnitud reducida de respuesta de linfocitos T CD4+.

25 **Ejemplo VI - Evaluación preclínica de la respuesta inmunitaria celular inducida por vacunas contra la gripe fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno de dosis baja) en ratones C57Bl/6 sensibilizados**

VI.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones sensibilizados a la gripe se realizaron con el fin de evaluar el aumento en las respuestas inmunitarias celulares por AS03 inducido por vacunas contra la gripe que contienen antígeno de dosis baja (0,5 µg/cepa, 1/30 de la dosis humana) y formuladas con este adyuvante de aceite en agua. Para simular la situación humana se realizó un experimento usando ratones sensibilizados con cepas heterosubtípicas.

VI.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 15)

Grupos de 15 ratones C57Bl/6 hembra adultos se sensibilizaron intranasalmente (20 µl de volumen) en el día 0 con el virus de la gripe inactivado con formalina completo trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de sensibilización consistieron en variantes de desviación anteriores (5 µg de HA para H1N1 A/Pekín/262/95, H3N2 A/Panamá/2007/99, B/Shandong/7/97 inactivadas completas) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones se vacunaron con una dosis única del candidato a vacuna intramuscularmente en un volumen total de 50 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados solos (simples fraccionados trivalentes) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados adyuvantados con tres dosis de AS03 (completa, 1/2 ó 1/5). Las cepas usadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos víricos de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (0,5 µg/cepa, 1/30 de la dosis humana).

Tabla 15

| Gr | Antígeno / formulación | Otro tratamiento |
|----|--|-------------------------------|
| 1 | Fraccionado trivalente / simple (no adyuvantada) | Sensibilización heteróloga D0 |
| 2 | Fraccionado trivalente / AS03 | Sensibilización heteróloga D0 |
| 3 | Fraccionado trivalente / AS03 1/2 | Sensibilización heteróloga D0 |
| 4 | Fraccionado trivalente / AS03 1/5 | Sensibilización heteróloga D0 |
| 5 | PBS | Sensibilización heteróloga D0 |

VI.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Fraccionada trivalente / simple

- 5 Las formulaciones para una dosis de 50 µl se preparan extemporáneamente según la secuencia: agua para inyección + tampón de solución salina (PBS concentrado 10 veces a pH 7,4 preparado como se enseña en el Ejemplo IV) + lote de Fluarix DFLUA014 (0,5 µg por cepa en la dosis final).

Fraccionada trivalente / AS03

- 10 Las formulaciones para una dosis de 50 µl se preparan extemporáneamente según la secuencia: agua para inyección + tampón de solución salina (PBS concentrado 10 veces a pH 7,4 preparado como se enseña en el Ejemplo IV) + lote de Fluarix DFLUA014 (0,5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis completa o 12,5 µl de emulsión SB62 para 1/2 de la dosis o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 de la dosis. Las formulaciones se inyectan dentro de la hora siguiente al fin de la preparación.

VI.1.3. Lecturas (Tabla 16)

- 15 La respuesta inmunitaria celular se probó 7 días después de la inmunización por tinción intracelular de citocinas.

Tabla 16

| Lectura | Momento de tiempo | Tipo de muestra | Procedimiento de análisis |
|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| Respuesta celular | D35 | PBMC | ICS |

VI.2. Resultados

VI.2.1. Inmunidad celular

- 20 Los resultados se presentan en la Figura 8. Se observaron respuestas de linfocitos T CD4+ marginalmente mayores en ratones inmunizados con vacuna fraccionada trivalente adyuvantada con AS03 (dosis completa o 1/2 de la dosis) en comparación con ratones inmunizados con simple fraccionada trivalente. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con fraccionada trivalente simple o adyuvantada con una dosis completa o media dosis de AS03 se observaron mayores respuestas celulares cuando los ratones se inmunizaron con fraccionada trivalente adyuvantada con 1/5 de la dosis de AS03.

VI.3. Resumen de resultados y conclusiones

- 30 En conclusión, se observó un aumento mínimo en las respuestas de linfocitos T CD4+ en animales sensibilizados heterosubtipicos cuando se usaron vacunas adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna simple. No se observó respuesta a dosis de adyuvante en este experimento y de hecho un 1/5 de la dosis de AS03 indujo mayores frecuencias de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que las observadas con mayor dosis de adyuvante. En general, estos datos generados usando 0,5 µg de HA por cepa no son similares a los datos de otros experimentos preclínicos generados usando 1,5 µg de HA por cepa.

Ejemplo VII - Evaluación preclínica de vacunas contra H5N1 fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo

35 VII.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones sin tratamiento previo con H5N1 se realizaron con el fin de evaluar el aumento en las

- respuestas inmunitarias humorales y celulares por AS03 inducidas por vacunas contra H5N1 fraccionadas formuladas con este adyuvante de aceite en agua. En el caso de una pandemia se espera que toda la población mundial esté sin tratamiento inmunológico previo a la cepa de la gripe pandémica recientemente en circulación. Debido a este estado inmunitario sin tratamiento previo, una vacuna pandémica requerirá probablemente dos dosis de vacuna para proteger a los individuos de la infección y la grave enfermedad producida por una nueva cepa de la gripe. Para representar esta falta de exposición previa se desarrolló un modelo de ratón sin tratamiento previo para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas.

VII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 17)

- Grupos de 15 ratones C57Bl/6 hembra adultos sin tratamiento previo se inmunizaron en los días 0 y 21 con un candidato a vacuna contra H5N1 pandémica intramuscularmente en un volumen total de 50 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados H5N1 solos (H5N1 simples fraccionados) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados adyuvantados con diferentes dosis de AS03 (doble, completa, 1/2 ó 1/5). Las cepas usadas para las inmunizaciones incluyeron antígeno vírico H5N1 A/Vietnam/1194/04 (1,5 ó 0,38 µg/cepa se corresponde con 1/10 de la dosis humana).
- No se hizo formulación con una dosis de AS03 doble, sino más bien una inyección concomitante de una dosis completa de 50 µl de fraccionada contra H5N1 / dosis completa de AS03 + una dosis de 50 µl de AS03.

Tabla 17

| Gr | Antígeno / formulación | Dosis de antígeno |
|----|---|-------------------|
| 1 | Fraccionada contra H5N1 / simple (no adyuvantada) | 1,5 µg |
| 2 | Fraccionada contra H5N1 / dosis doble de AS03 | 1,5 µg |
| 3 | Fraccionada contra H5N1 / AS03 | 1,5 µg |
| 4 | Fraccionada contra H5N1 / AS03 1/2 | 1,5 µg |
| 5 | Fraccionada contra H5N1 / AS03 1/5 | 1,5 µg |
| 6 | Fraccionada contra H5N1 / simple (no adyuvantada) | 0,38 µg |
| 7 | Fraccionada contra H5N1 / dosis doble AS03 | 0,38 µg |
| 8 | Fraccionada contra H5N1 / AS03 | 0,38 µg |
| 9 | Fraccionada contra H5N1 / AS03 1/2 | 0,38 µg |
| 10 | Fraccionada contra H5N1 / AS03 1/5 | 0,38 µg |
| 11 | PBS | |

VII.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

- Preparación de un litro de tampón de cargar final (PBS a pH 7,2 ± 0,2): a 0,800 l de agua para inyección, añadir NaCl 7,699 g, KCl 0,200 g, MgCl₂ x 6H₂O 0,100 g, Na₂HPO₄ x 12H₂O 2,600 g, KH₂PO₄ 0,373 g. Después de la solubilización, ajustar a 1,0 l con agua para inyección

Fraccionada contra H5N1 / simple

Preparación de una dosis de 50 µl:

- Se añaden tiomersal (cantidades teniendo en cuenta su concentración en la cepa) y Triton X100 al tampón de cargar final. No se añade Tween 80 ya que el contenido diana en la formulación se alcanza por la concentración de Tween de la cepa. Las concentraciones finales son de 10 µg/ml para tiomersal, 368 µg/ml para Tween 80 y 35 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 1,5 µg. Son de 10 µg/ml para tiomersal, 93 µg/ml para Tween80 y 8,9 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 0,38 µg. Después de 5-30 min de agitación magnética se añaden 1,5 ó 0,38 µg de HA (cepa H5N1). Las formulaciones se agitan durante 30-60 minutos. El pH se comprueba. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente al fin de la formulación.

Fraccionada contra H5N1 / AS03

Preparación de una dosis de 50 µl:

5 Se añaden tiomersal (cantidades teniendo en cuenta su concentración en la cepa) y Triton X100 al tampón de cargar final. No se añade Tween 80 ya que el contenido diana en la formulación se alcanza por la concentración de Tween de la cepa. Las concentraciones finales son de 10 µg/ml para tiomersal, 368 µg/ml para Tween 80 y 35 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 1,5 µg. Son de 10 µg/ml para tiomersal, 93 µg/ml para Tween 80 y 8,9 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 0,38 µg. Después de 5-30 min de agitación magnética se añaden 1,5 ó 0,38 µg de HA (cepa H5N1). Después de 30-60 minutos de agitación magnética se añaden 25 ó 12,5 ó 5 µl de emulsión SB62. Las formulaciones se agitan durante 30-60 minutos. El pH se comprueba. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente al fin de la formulación.

VII.1.3. Lecturas (Tabla 18A)

10 La respuesta inmunitaria humoral se midió 14 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) por títulos de anticuerpos anti-Ig, IgG1 y IgG2b (Figura 9, A-F). La respuesta inmunitaria humoral también se midió 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) por ensayo de inhibición de la hemaglutinación de anti-H5N1 (Figura10, A-B).

15 La respuesta inmunitaria celular se probó 6 días después de la inmunización (5 conjuntos de 3 ratones por grupo) por tinción intracelular de citocinas (ICS) de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno numerados por citometría de flujo (Figura 11, A-B).

Tabla 18A

| Lectura | Momento de tiempo | Tipo de muestra | Procedimiento de análisis |
|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------------------|
| Respuesta humoral | D42 | Sueros | ELISA, isotipos y títulos de HI |
| Respuesta celular | D47 | PBMC | ICS |

VII.2. Resultados

20 VII.2.1. Respuesta inmunitaria humoral: ELISA e isotipos.

Los resultados se presentan en la Figura 9 y en la Tabla 18B.

Tabla 18B

| | Fraccionada contra H5N1 SIMPLE | Fraccionada contra H5N1 2 X AS03 | Fraccionada contra H5N1 AS03 | Fraccionada contra H5N1 AS03/2 | Fraccionada contra H5N1 AS03/5 | PBS |
|---|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----|
| Respuesta de Ig (títulos del punto medio por ELISA) | | | | | | |
| 1,5 µg/ratones | 177 | 81680 | 59734 | 67772 | 57697 | 50 |
| 0,38 µg/ratones | 120 | 91319 | 76144 | 49162 | 54566 | |
| Respuesta de IgG1 (títulos del punto medio por ELISA) | | | | | | |
| 1,5 µg/ratones | 124 | 54683 | 44965 | 40558 | 39854 | 50 |
| 0,38 µg/ratones | 144 | 62445 | 44381 | 31855 | 39269 | |
| Respuesta de IgG2b (títulos del punto medio por ELISA) | | | | | | |
| 1,5 µg/ratones | 190 | 10928 | 10625 | 11215 | 7903 | 79 |
| 0,38 µg/ratones | 60 | 20993 | 12617 | 9352 | 9565 | |
| Relación de IgG1/IgG2b | | | | | | |
| 1,5 µg/ratones | 0,7 | 5 | 4,2 | 3,6 | 5 | 79 |
| 0,38 µg/ratones | 2,4 | 3 | 3,5 | 3,4 | 4,1 | |

25 A cada dosis de vacuna fraccionada contra H5N1, todos los grupos adyuvantados indujeron mayores títulos de anticuerpos Ig, IgG1 y IgG2b anti-H5N1 en comparación con la vacuna fraccionada contra H5N1 no adyuvantada (Figuras 9 - A a F). A cada dosis de vacuna fraccionada contra H5N1; la respuesta de anticuerpos IgG1 dirigidos contra H5N1 fue 4-5 veces superior a la respuesta de anticuerpos IgG2b dirigidos contra H5N1 (Figuras 9 - C a F).

Con una dosis de 1,5 µg de HA de vacuna fraccionada contra H5N1 y combinada con cada dosis de adyuvante no se observó diferencia de respuestas de anticuerpos Ig, IgG1 y IgG2b dirigidos contra H5N1 (Figuras 9 - A, C y E).

5 Con una dosis de 0,38 µg de HA de vacuna fraccionada contra H5N1 se obtuvo una tendencia a mayores títulos de Ig dirigida contra H5N1 después de la inmunización con vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con 2x dosis completa en comparación con la respuesta inducida por la vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con AS03/2 (p=0,7315) y AS03 1/5 (p=0,9744) (Figura 9-B). Esta tendencia también se observó para la respuesta de anticuerpos IgG1 dirigidos contra H5N1 (Figura 9 - D). Sin embargo, la potencia no fue suficiente para observar una diferencia estadísticamente significativa (25% de potencia para una diferencia de 1,7 veces, o 47% para una diferencia de 2 veces).

10 VII.2.2. Respuesta inmunitaria humoral: títulos de HI

Con una dosis de 1,5 µg de HA/ratones:

15 A cada dosis de adyuvante, todos los ratones inmunizados con la vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con AS03 indujeron mayores títulos de HI en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna fraccionada contra H5N1 no adyuvantada (Figura 10-A). No se observó diferencia estadísticamente significativa de títulos de HI cuando la vacuna fraccionada contra H5N1 se adyuvantó con un intervalo de dosis de AS03 (Figura 10-A).

Con una dosis de 0,38 µg de HA/dosis

20 A cada dosis de adyuvante, todos los ratones inmunizados con vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con AS03 indujeron mayores títulos de HI en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna fraccionada contra H5N1 no adyuvantada (Figura 10B).

Se observaron títulos de HI significativamente mayores con la vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con 2x dosis completa de AS03 en comparación con la respuesta obtenida con la vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con AS03/2 (p=0,032 para una diferencia de 4 veces) (Figura 10B).

25 No se observó diferencia estadísticamente significativa de títulos de HI en ratones inmunizados con la vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con 2x dosis completa de AS03 o una dosis completa de AS03 o entre ratones inmunizados con vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con AS03/2 o AS03/5 (Figura 10B).

Comparación entre dosis de antígeno (1,5 µg o 0,38 µg):

30 No se observó diferencia estadísticamente significativa de títulos de HI entre ratones inmunizados con cada dosis de HA de la vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con AS03, AS03/2 o AS03/5, excepto entre ratones inmunizados con 1,5 µg de HA de fraccionada contra H5N1 adyuvantada con AS03/5 que mostró título de HI significativamente menor (p=0,01) que con ratones inmunizados con 0,38 µg de HA de fraccionada contra H5N1 adyuvantada con 2x dosis completa de AS03 (Figura 10).

VII.2.3. Respuesta inmunitaria celular

35 Para la evaluación de respuestas inmunitarias celulares inducidas por una vacuna contra la gripe estacional trivalente, 1 µg de HA de antígeno fraccionado por cepa se usó para la reestimulación de linfocitos T CD4. Con el fin de mantener las mismas condiciones de reestimulación para la vacuna contra la gripe de H5N1 monovalente, 3 µg de HA del antígeno fraccionado monovalente se usaron en este experimento. También se mostró que esta concentración era óptima para la discriminación entre diferentes adyuvantes. Los resultados se presentan en la Figura 11.

40 A cada dosis de vacuna fraccionada contra H5N1 (1,5 ó 0,38 µg) se observaron mayores respuestas de linfocitos T CD4+ en ratones inmunizados con la vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada con diversas dosis de AS03 en comparación con ratones inmunizados con la vacuna fraccionada contra H5N1 no adyuvantada.

45 A una dosis de 1,5 µg de vacuna fraccionada contra H5N1, una reducción de la dosis de AS03 se correspondió con una disminución en las frecuencias de linfocitos T CD4+ (Figura 11A). Sin embargo, a una dosis de 0,38 µg de vacuna fraccionada contra H5N1 no se observó diferencia en respuestas de linfocitos T CD4+ entre diferentes dosis de adyuvante en ratones inmunizados con vacunas fraccionadas contra H5N1 adyuvantadas con AS03 (Figura 11B).

VII.3. Resumen de resultados y conclusiones

50 Los estudios de inmunogenicidad en ratones mostraron que la vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada indujo respuestas humorales (títulos de ELISA y de HI anti-H5N1) y celulares (linfocitos T CD4 +) significativamente mayores que las inducidas por la vacuna fraccionada contra H5N1 no adyuvantada.

No se observó efecto de respuesta a dosis de antígeno para la respuesta inmunitaria humoral entre ratones inmunizados con 1,5 µg y 0,38 µg de vacuna fraccionada contra H5N1 adyuvantada, excepto para los dos grupos

mencionados en la Sección VII.2.2, sugiriendo que en presencia de adyuvante pueden requerirse incluso dosis de HA menores para observar un efecto de respuesta a dosis en este modelo.

5 Se observó un fuerte aumento en las respuestas de linfocitos T CD4+ en ratones sin tratamiento previo cuando se usaron vacuna pandémicas contra H5N1 adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna contra H5N1 simple. No se observó impacto de la dilución de AS03 cuando se usó una dosis de 0,38 µg de vacuna fraccionada contra H5N1 como candidato a vacuna, mientras que se observó una disminución de respuestas de linfocitos T CD4 cuando 1,5 µg de vacuna fraccionada contra H5N1 se adyuvantó con la dosis reducida de AS03.

10 Como se ha observado previamente, no se observó diferencia en respuestas inmunitarias humorales y celulares entre ratones inmunizados con la vacuna fraccionada contra H5N1 (a cualquier dosis de antígeno) adyuvantada con una dosis completa de AS03 o con AS03/2. Se detectó algún potenciamiento en la respuesta inmunitaria cuando se usó 2x dosis completa de AS03 en la formulación de vacunas y, por consiguiente, se detectó una disminución en la respuesta inmunitaria cuando se usó AS03/5 en la formulación de vacunas.

En conjunto, los datos informados aquí soportan la potencia de este sistema de adyuvante novedoso en esta formulación de vacunas.

15 **Ejemplo VIII - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe adyuvantadas y no adyuvantadas en cerdos Large White sensibilizados**

VIII.1. Diseño experimental y objetivo

El experimento en cerdos sensibilizados a la gripe se realizó con el fin de evaluar el aumento en las respuestas humorales por AS03 inducidas por vacunas contra la gripe formuladas con este adyuvante de aceite en agua.

20 Se usaron cerdos con el fin de evaluar un intervalo de dosis de AS03 en un modelo animal próximo a seres humanos. Los cerdos muestran una larga lista de analogías biológicas que establecen este animal como fisiológicamente el más próximo al hombre con muy pocas excepciones (Douglas R., 1972). Además, la manifestación de infección de la gripe en cerdos es comúnmente observada.

VIII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 19)

25 Grupos de 10 cerdos hembra Large White adultos se sensibilizaron en el día 0 con virus de la gripe inactivado con formalina completo trivalente (25 µg de HA para cada cepa) intranasalmente en un volumen total de 200 µl. Las cepas de sensibilización consistieron en cepas homólogas a la cepas de la vacuna (25 µg de HA para H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shandong/7/97 completo inactivado). Veintiocho días después, los cerdos se vacunaron con una dosis única del candidato a vacuna intramuscularmente en un volumen total de 500 µl. Los cerdos se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados solos (simples fraccionados trivalentes) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados adyuvantados con un intervalo de dosis de AS03 (completa, 1/2 ó 1/5). Las cepas usadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos víricos de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shandong/7/97 (15 µg de HA para cepas H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y 17,5 µg de cepa B/Shandong/7/97 como en una dosis humana).

Tabla 19

| Gr | Antígeno / formulación | Otro tratamiento |
|----|--|-----------------------------|
| 1 | Fraccionado trivalente / simple (no adyuvantada) | Sensibilización homóloga D0 |
| 2 | Fraccionado trivalente / AS03 | Sensibilización homóloga D0 |
| 3 | Fraccionado trivalente / AS03 1/2 | Sensibilización homóloga D0 |
| 4 | Fraccionado trivalente / AS03 1/5 | Sensibilización homóloga D0 |

VIII.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Simple fraccionada trivalente

40 Una premezcla de Tween 80, Triton X100 y succinato de vitamina E (VES) se prepara con el fin de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades usadas en la premezcla tienen en cuenta su contenido en las cepas.

La formulación de una dosis de 500 µl se prepara extemporáneamente según la secuencia: agua para inyección + tampón de solución salina (PBS concentrado 10 veces a pH 7,4 preparado como se enseña en el Ejemplo IV) +

premezcla, 5 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de HA para la cepa H1N1, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de HA para la cepa H3N2, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17,5 µg de HA para la cepa B, 15 min de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectan dentro de la hora siguiente al fin de su preparación.

5 **Fraccionada trivalente /AS03**

Una premezcla de Tween 80, Triton X100 y succinato de vitamina E (VES) se prepara con el fin de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades usadas en la premezcla tienen en cuenta su contenido en las cepas.

10 La formulación de una dosis de 500 µl se prepara extemporáneamente según la secuencia: agua para inyección + tampón de solución salina (PBS concentrado 10 veces a pH 7,4 preparado como se enseña en el Ejemplo IV) + premezcla, 5 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de HA para la cepa H1N1, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de HA para la cepa H3N2, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17,5 µg de HA para la cepa B, 15 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 250 µl de emulsión SB62 para la dosis completa de AS03 o 125 µl de emulsión SB62 para 1/2 dosis de AS03 o 50 µl de emulsión SB62 para 1/5 de dosis de AS03, 15 min de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectan dentro de la hora siguiente al fin de su preparación.

VIII.1.3. Lecturas (Tabla 20)

20 La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió antes de la sensibilización intranasal (día 0), antes de la inmunización (día 28) y 14 días después de la inmunización (10 cerdos/grupo). Las muestras de suero se probaron por la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI).

Tabla 20

| Lectura | Momento de tiempo | Tipo de muestra | Procedimiento de análisis |
|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| Respuesta humoral | D0, D28, D42 | Sueros | IHA |

VIII.2. Los resultados y conclusiones

VIII.2.1. Inmunidad humoral

25 Los resultados se presentan en la Figura 12. Independientemente de la dilución del adyuvante, las formulaciones fraccionadas trivalentes adyuvantadas con AS03 indujeron una mayor respuesta de HI a todas las cepas que la formulación trivalente simple en este modelo de sensibilización homóloga, aunque la significancia estadística no siempre se alcanzó para las tres cepas. Se observó un efecto de la dosis de adyuvante con ligeras diferencias de cepa a cepa. Para cepas menos inmunogénicas tales como B/Shandong, sólo la vacuna fraccionada trivalente adyuvantada con una dosis completa de AS03 fue significativamente diferente de la vacuna simple. A diferencia de la vacuna fraccionada trivalente adyuvantada con una dosis completa de AS03, una dosis reducida de AS03 fracasó en aumentar los títulos de HI para las tres cepas anteriores por encima de aquellos observados con la vacuna simple.

35 **Ejemplo IX - Evaluación preclínica de vacunas trivalentes o cuadrivalentes fraccionadas adyuvantadas y no adyuvantadas (que contienen una segunda cepa B) en ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo y sensibilizados**

IX.1. Diseño experimental y objetivo

40 Los experimentos en ratones sin tratamiento previo y sensibilizados se realizaron con el fin de evaluar el aumento en la respuesta inmunitaria humoral inducida por las vacunas trivalentes o cuadrivalente fraccionadas contra la gripe (que contienen una segunda cepa B) formuladas con este adyuvante de emulsión de aceite en agua (AS03 o media dosis de AS03). El análisis filogénico de los genes de HA del virus de la gripe B recientemente aislados demostró que ya a mediados de 1980 este gen había evolucionado en dos linajes antigénicamente distintos representados por virus similares a B/Victoria/2/87 y similares a B/Yamagata/16/88. Estos experimentos evaluaron el impacto de la presencia de una segunda cepa B en la vacuna contra la gripe cuadrivalente (QIV) sobre la respuesta inmunitaria humoral en comparación con la respuesta inducida por la vacuna contra la gripe trivalente (TIV).

IX.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 21)

Estos experimentos se realizaron usando grupos de 10 ratones sin tratamiento previo C57Bl/6 hembra adultos o ratones sensibilizados con cepas heterólogas en comparación con cepas de la vacuna.

Los ratones sin tratamiento previo se inmunizaron en los días 0 y 28 con candidato a vacuna contra la gripe

trivalente o cuadrivalente intramuscularmente en un volumen total de 1000 µl.

Los ratones sensibilizados recibieron primero una administración intranasal (20 µl de volumen) en el día 0 con virus de la gripe inactivado con formalina completo trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de sensibilización consistieron en variantes de desviación (5 µg de HA para H1N1 A/Pekín/262/95, H3N2 A/Wellington/1/04 y B/Brisbane/32/02 inactivadas completas) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones se vacunaron con una dosis única del candidato a vacuna intramuscularmente en un volumen total de 100 µl.

Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían TIV o QIV solas (vacuna simple) o formulaciones que contenían TIV o QIV adyuvantadas con diferentes dosis de AS03 (completa o media (1/2)). Las cepas usadas para las inmunizaciones incluyeron H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Wisconsin/52/05 y B/Shandong/7/97 (el linaje de B/Victoria se incluyó tanto en TIV como en QIV) y para la vacuna QIV también B/Jiangsu/10/03 (el linaje de B/Yamagata sólo se incluyó en QIV) (1,5 µg/cepa se corresponde con 1/10 de la dosis humana).

Tabla 21

| Grupo | Antígeno / formulación | Dosis de antígeno |
|-------|-----------------------------|-------------------|
| 1 | TIV simple (no adyuvantada) | 1,5 µg |
| 2 | TIV AS03 | 1,5 µg |
| 3 | TIV AS03/2 | 1,5 µg |
| 4 | QIV simple (no adyuvantada) | 1,5 µg |
| 5 | QIV AS03 | 1,5 µg |
| 6 | QIV AS03/2 | 1,5 µg |
| 7 | PBS | |

15 IX.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

TIV simple (no adyuvantada)

Preparación de una dosis de 100 µl:

PBS concentrado 10 veces y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades teniendo en cuenta los detergentes presentes en las cepas) se añaden a agua para inyección. Las concentraciones finales son 354 µg/ml para Tween 80, 52 µg/ml para Triton X-100, 47,37 µg/ml para VES en la formulación. Después de 5 min de agitación magnética se añaden 1,5 µg de cada cepa (cepas H1N1, H3N2, B) con 10 min de agitación magnética entre cada adición. Entonces, la formulación se agita durante 15 min. El pH se comprueba. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente al fin de la formulación.

TIV AS03 o AS03 1/2

Preparación de una dosis de 100 µl:

PBS concentrado 10 veces y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades teniendo en cuenta los detergentes presentes en las cepas) se añaden a agua para inyección. Las concentraciones finales son 354 µg/ml para Tween 80, 52 µg/ml para Triton X-100, 47,37 µg/ml para VES en la formulación. Después de 5 min de agitación magnética se añaden 1,5 µg de cada cepa (cepas H1N1, H3N2, B) con 10 min de agitación magnética entre cada adición. Después de 15 min de agitación magnética se añaden 25 µl o 12,5 µl de emulsión SB62.

Entonces, la formulación se agita durante 15 min. El pH se comprueba. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente al fin de la formulación.

QIV simple (no adyuvantada)

Preparación de una dosis de 100 µl:

PBS concentrado 10 veces y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades teniendo en cuenta los detergentes presentes en las cepas) se añaden a agua para inyección. Las concentraciones finales son 472 µg/ml para Tween 80, 69,44 µg/ml para Triton X-100, 63,16 µg/ml para VES en la formulación. Después de 5 min de agitación magnética se añaden 1,5 µg de cada cepa (H1N1, H3N2, 2 cepas B) con 10 min de agitación magnética

entre cada adición. Entonces, la formulación se agita durante 15 min. El pH se comprueba. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente al fin de la formulación.

QIV AS03 o AS03 1/2

Preparación de una dosis de 100 µl:

- 5 PBS concentrado 10 veces y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades teniendo en cuenta los detergentes presentes en las cepas) se añaden a agua para inyección. Las concentraciones finales son 472 µg/ml para Tween 80, 69,44 µg/ml para Triton X-100, 63,16 µg/ml para VES en la formulación. Después de 5 min de agitación magnética se añaden 1,5 µg de cada cepa (H1N1, H3N2, 2 cepas B) con 10 min de agitación magnética entre cada adición. Después de 15 min de agitación magnética se añaden 25 µl o 12,5 µl de emulsión SB62.
- 10 Entonces, la formulación se agita durante 15 min. El pH se comprueba. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente al fin de la formulación.

IX.1.3. Lecturas (Tabla 22)

15 En ratones sin tratamiento previo, la respuesta inmunitaria humoral se midió 28 días después de la primera inmunización (D28 después de I) y 21 días después de la segunda inmunización (D21 después de II) en 10 ratones por grupo por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (Figura 13).

En ratones sensibilizados, la respuesta inmunitaria humoral se midió 28 días después de la sensibilización (Día 28 después de sensib) y 21 días después de the single inmunización (D21 después de inmuniz) en 10 ratones por grupo por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (Figura 14).

20 Con el fin de simplificar y de basarse en el objetivo de este experimento sólo se describieron las respuestas inmunitarias humorales inducidas contra las cepas B.

Tabla 22

| Momento de tiempo de la lectura | Tipo de muestra | Procedimiento de análisis |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------|
| Respuesta humoral Días 28 y 49 | Sueros | Títulos de HI |

IX.2. Resultados

IX.2.1. Respuesta inmunitaria humoral en ratones sin tratamiento previo: títulos de HI

25 Ratones sin tratamiento previo inmunizados con vacunas fraccionadas contra la gripe adyuvantadas indujeron mayores títulos de HI en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con las vacunas fraccionadas contra la gripe no adyuvantadas (Figura 13, A y B).

30 Independientemente del adyuvante (AS03 o AS03/2), los ratones sin tratamiento previo inmunizados con la TIV adyuvantada o la QIV adyuvantada indujeron títulos de HI similares contra B/Shandong/7/97 (el virus similar a B/Victoria se incluyó tanto en TIV como en QIV) (Figura 13; A).

Independientemente del adyuvante (AS03 o AS03/2), los ratones inmunizados sin tratamiento previo con la QIV adyuvantada indujeron mayores títulos de HI contra B/Jiangsu/10/03 (el virus similar a B/Yamagata sólo se incluyó en QIV) en comparación con la ausencia de títulos de HI observada en ratones sin tratamiento previo inmunizados con la TIV adyuvantada (Figura 13; B).

35 IX.2.2. Respuesta inmunitaria humoral en ratones sensibilizados: títulos de HI

Ratones sensibilizados con un virus similar a B/Victoria e inmunizados con vacunas fraccionadas contra la gripe adyuvantadas indujeron mayores títulos de HI en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con las vacunas fraccionadas contra la gripe no adyuvantadas (Figura 14, A y B).

40 Independientemente del adyuvante (AS03 o AS03/2), los ratones sensibilizados con un virus similar a Victoria e inmunizados con la TIV adyuvantada o la QIV adyuvantada indujeron títulos de HI similares contra el virus B/Shandong/7/97 (el virus similar a B/Victoria se incluyó tanto en TIV como en QIV) (Figura 14; B).

45 Independientemente del adyuvante (AS03 o AS03/2), los ratones sensibilizados con un virus similar a Victoria e inmunizados con la QIV adyuvantada indujeron mayores títulos de HI contra B/Jiangsu/10/03 (el virus similar a B/Yamagata sólo se incluyó en QIV) en comparación con la ausencia de títulos de HI observada en ratones sin tratamiento previo inmunizados con la TIV adyuvantada (Figura 14; B).

IX.3. Resumen de resultados y conclusiones

5 Ratones sin tratamiento previo, o ratones sensibilizados con un virus similar a B/Victoria, inmunizados con la vacuna TIV o QIV adyuvantada (AS03 o AS03/2) mostraron reactividad cruzada contra el virus homotípico similar a B/Victoria incluido en la vacuna o un virus heterosubtípico que pertenece al mismo linaje de B/Victoria. Ratones sin tratamiento previo, o ratones sensibilizados con un virus similar a B/Victoria, inmunizados con la vacuna TIV adyuvantada (AS03 o AS03/2) no mostraron reactividad cruzada contra un virus heterosubtípico que pertenecía a otro linaje (virus similar a B/Yamagata en este ejemplo) en comparación con el virus B incluido en la vacuna.

Estos experimentos demostraron que se necesita una segunda cepa B y el adyuvante (AS03 o AS03/2) con el fin de inducir una reacción cruzada contra un virus B que pertenece a tanto los linajes de B/Victoria como de B/Yamagata.

10 **Ejemplo X - Ensayo clínico en una población de 18-64 años de edad con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe fraccionado y diversas dosis de adyuvante AS03 (Flu-LD-012)**

X.1. Introducción

15 Se realizó un estudio de simple ciego aleatorizado controlado de fase II en una población adulta de 18-64 años de edad en 2007 con el fin de evaluar la inmunogenicidad, seguridad y reactogenicidad de la vacuna candidata contra la gripe de dosis baja de GlaxoSmithKline Biologicals (es decir, que contiene 5 µg de HA por cepa) con diversas dosis de adyuvante AS03, administrada intramuscularmente, en comparación con Fluarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals) usada como referencia.

X.2. Diseño del estudio

Cinco grupos de sujetos (200 por grupo) recibieron en paralelo las siguientes vacunas IM:

- FluLD1/1: 5 µg de HA/cepa de vacuna contra la gripe adyuvantada con 1/1 de dosis de AS03
- 20 - FluLD1/2: 5 µg de HA/cepa de vacuna contra la gripe adyuvantada con 1/2 de dosis de AS03
- FluLD1/4: 5 µg de HA/cepa de vacuna contra la gripe adyuvantada con 1/4 de dosis de AS03
- FluLD1/8: 5 µg de HA/cepa de vacuna contra la gripe adyuvantada con 1/8 de dosis de AS03
- Un grupo de 200 sujetos que recibió una dosis completa del programa de 15 µg de HA/cepa de Fluarix™: una inyección IM de vacuna contra la gripe en el día 0, recogida de muestra de sangre en el día 0, día 21 y día 180 después de la vacunación.
- 25

La vacuna contra la gripe fraccionada trivalente convencional Fluarix™ usada en este estudio es una vacuna comercial del hemisferio norte del año 2007/2008 desarrollada y fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals.

X.2. Objetivos del estudio

X.2.1. Objetivo primario: inmunogenicidad

30 Demostrar la no inferioridad inmunológica (GMT) de la vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de dosis de AS03) frente a *Fluarix* 21 días tras vacunación en todos los sujetos.

Variable observada:

- En los días 0 y 21: título de anticuerpos de la inhibición de la hemaglutinación en suero (HI), contra cada una de las tres cepas de la vacuna, en todos los sujetos.

35 *Variable derivada:*

- Títulos medios geométricos (GMT) de títulos de anticuerpos de HI en los días 0 y 21.

X.2.2. Objetivos secundarios

- Evaluar la respuesta inmunitaria humoral en términos de títulos de anticuerpos de anti-hemaglutinina (HI) provocados por la vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de dosis de AS03) y por *Fluarix* 21 días tras la vacunación en todos los sujetos.
- Evaluar la persistencia de anticuerpos de HI de la vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de dosis de AS03) y por *Fluarix* 180 días tras la vacunación en todos los sujetos.
- Evaluar la respuesta inmunitaria mediada por célula inducida por la vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de dosis de AS03) y *Fluarix* en términos de frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 específicos de la gripe en el día 0, 21 y 180 en un subconjunto de sujetos.
- 45

- Evaluar la respuesta inmunitaria humoral en términos de títulos de anticuerpos neutralizantes inducida por la vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de dosis de AS03) y *Fluarix* en el día 0, 21 y 180 en un subconjunto de sujetos.
- Evaluar la seguridad y la reactogenicidad de la vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de dosis de AS03) y *Fluarix* durante el periodo del estudio completo en todos los sujetos (seguimiento de síntomas esperados durante 7 días, seguimiento de síntomas inesperados durante 21 días, seguimiento de acontecimientos adversos graves y condiciones médicamente significativas durante 6 meses).

Variables observadas para la respuesta humoral:

- En el día 0, 21 y 180: título de anticuerpos de la inhibición de la hemaglutinación en suero (HI), contra cada una de las tres cepas de la vacuna, en todos los sujetos.
- En los días 0, 21 y 180: títulos de anticuerpos neutralizantes, probados por separado contra cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna, en un subconjunto de sujetos.

Variables derivadas:

- Títulos medios geométricos (GMT) de títulos de anticuerpos de HI en los días 0, 21 y 180
- Tasas de seroconversión* en el día 21
- Factores de seroconversión** en el día 21
- Tasas de seroprotección*** en los días 0 y 21

* La tasa de seroconversión se define como el porcentaje de vacunados que tienen tanto un título antes de la vacunación $< 1:10$ como un título después de la vacunación $\geq 1:40$ o un título antes de la vacunación $\geq 1:10$ y al menos un aumento de cuatro veces en el título después de la vacunación.

** El factor de seroconversión se define como el aumento en veces en GMT de HI en suero después de la vacunación en comparación con el día 0.

*** La tasa de seroprotección se define como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero $\geq 1:40$ que normalmente es aceptado como que indica protección.

Variables observadas para la respuesta CMI (en un subconjunto de sujetos):

- En los días 0, 21 y 180:
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 en pruebas que producen al menos dos moléculas señal diferentes (IL-2, IFN- γ , TFN- α y CD40L).
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 en pruebas que producen al menos CD40L y otra molécula señal (IL-2, IFN- γ , TFN- α).
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 en pruebas que producen al menos IL-2 y otra molécula señal (CD40L, IFN- γ , TFN- α).
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 en pruebas que producen al menos TFN- α y otra molécula señal (IL-2, IFN- γ , CD40L).
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 en pruebas que producen al menos IFN- γ y otra molécula señal (CD40L, IL-2, TFN- α).

Variables derivadas

- Para cada prueba, media geométrica (GM) de linfocitos T CD4/CD8 de la gripe específicos en el día 0, 21, 180.

X.2.3. Otros objetivos:

- Evaluar la respuesta inmunitaria humoral en términos de títulos de HI heterólogos de vacuna (título de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación en suero (HI), contra cepas desviadas), en el día 0, 21 y 180 en un subconjunto de sujetos.
- Evaluar la respuesta inmunitaria humoral en términos de títulos de anticuerpos neutralizantes heterólogos de

vacuna (cepas del virus específicas de la gripe de reactividad cruzada (cepas desviadas)), en el día 0, 21 y 180 en un subconjunto de sujetos.

- Evaluar la respuesta CMI en términos de frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 específicos de la gripe de reactividad cruzada (cepas heterólogas) (cepas desviadas o epítopes de la gripe conservados), en el día 0, 21 y 180 en un subconjunto de sujetos.

Las variables derivadas y los criterios (tasas de seroprotección, seroconversión y factores de seroconversión) son como se han descrito anteriormente.

X.3. Composición y administración de vacunas

X.3.1. Preparación de vacunas

La vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03 usada en el estudio es una mezcla líquida de iguales cantidades (es decir, 3x 5 µg de HA) de tres antígenos de la gripe inactivados fraccionados diferentes adyuvantados con AS03. Se presenta como vacuna de monodosis en jeringuillas precargadas de vidrio (tipo I) a un volumen de 0,5 ml/dosis. Las formulaciones candidatas a vacunas contra la gripe de dosis baja adyuvantadas con AS03 contuvieron las siguientes cepas:

- Cepa similar a A/Islas Salomón/3/2006 (H1N1): A/Islas Salomón/03/2006 (IVR-145),
- Cepa similar a A/Wisconsin/67/2005 (H3N2): A/Wisconsin/67/2005 (NYMCX)-161 B,
- Cepa similar a B/Malasia/2506/2004: B/Malasia/2506/2004.

Las vacunas contuvieron 5 µg de hemaglutinina (HA) de cada cepa del virus de la gripe por dosis, combinadas con una dosis completa, media dosis, 1/4 de dosis o 1/8 de dosis del sistema de adyuvante AS03. Los antígenos de la gripe se incorporan en la fase acuosa del sistema de adyuvante por simple mezcla con la emulsión.

La vacuna contiene los siguientes residuos que se derivan del procedimiento de fabricación del principio activo: timerosal, albúmina de huevo, sacarosa, formaldehído y desoxicolato de sodio, y niveles residuales de timerosal (< 1 µg por dosis) de las fases tempranas del procedimiento de fabricación. La producción de las tres vacunas monovalentes de antígenos de virión fraccionados inactivados se realiza siguiendo el procedimiento de fabricación de la vacuna comercial Fluorix™. Se hace como se ha explicado en la Sección III.4.1.2. El fraccionamiento se lleva a cabo con desoxicolato de sodio antes de la etapa de inactivación, que se realiza con formaldehído.

X.3.2. Composición de vacuna

Una dosis de FluLD (completa, media dosis, 1/4 de dosis o 1/8 de dosis de AS03) se corresponde con 0,5 ml. La composición se proporciona en la Tabla 23. El contenido de HA por dosis es aproximadamente 5 µg para todas las formulaciones, siendo la única diferencia la cantidad de AS03 presente en los recipientes finales.

Tabla 23 Composición de vacuna contra la gripe de dosis baja adyuvantada con AS03

| Componente | Cantidad por dosis (0,5 ml) | | | |
|---|-----------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Viriones fraccionados inactivados | | | | |
| - A/Islas Salomón/03/2006 (IVR-145) | 5,0 µg de HA | | | |
| - A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) NYMCX-1 61 B | 5,0 µg de HA | | | |
| - B/Malasia/2506/2004 | 5,0 µg de HA | | | |
| Adyuvante | Dosis completa | Media dosis | 1/4 de dosis | 1/8 de dosis |
| - Emulsión SB62 (volumen total) | 0,250 ml | 0,125 ml | 0,0625 ml | 0,031 ml |
| • Escualeno | 10,70 mg | 5,35 mg | 2,675 mg | 1,337 mg |
| • DL-α-tocoferol | 11,88 mg | 5,94 mg | 2,97 mg | 1,5 mg |
| • Polisorbato 80 (Tween 80) | 4,85 mg | 2,425 mg | 1,21 mg | 0,6 mg |
| PBS mod | hasta 0,250 ml | | | |
| Excipientes (valor diana) | | | | |

| Componente | Cantidad por dosis (0,5 ml) |
|---|-----------------------------|
| Polisorbato 80 (Tween-80) | 0,40 mg |
| Octoxinol 10 (Triton® X-100) | 0,05 mg |
| Hidrogenosuccinato de alfa-tocoferilo | 0,05 mg |
| Cloruro sódico | 4 mg |
| Cloruro de magnesio | 0,03 mg |
| Fosfato de disodio | 1,30 mg |
| Hidrogenofosfato de potasio | 0,19 mg |
| Cloruro de potasio | 0,10 mg |
| Agua para inyección | hasta 0,50 ml |
| Abreviaturas: HA = Hemaglutinina; el contenido total en Polisorbato 80 se corresponde con 4,972 mg por dosis cuando se usa la dosis completa de AS03, y 2,547 mg por dosis cuando se usa media dosis de AS03. | |

X.3.3. Preparación de las composiciones de vacuna con adyuvante AS03

Preparación de antígeno ("vacuna intermedia"): Tween 80, Triton X-100 y VES se añaden a PBS mod Na/K (NaCl 132,7 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1,1 mM, Na₂HPO₄ 7,26 mM, KH₂PO₄ 2,72 mM, pH 7,2) en cantidades tales que las concentraciones finales en la vacuna intermedia fueran, respectivamente, de 952,5 µg/ml, 130,9 µg/ml y 119,1 µg/ml. Después de 15 a 45 minutos de agitación se añaden 35,71 µg de HA por ml de cada cepa H1N1, 36,90 µg/ml de cepa H3N2 y 39,29 µg de HA por ml de cepa B.

Vacuna adyuvantada: PBS mod Na/K (NaCl 132,7 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1,1 mM, Na₂HPO₄ 7,26 mM, KH₂PO₄ 2,72 mM, pH 7,2) se añade a agua para inyección para lograr un volumen final de 0,5 ml por dosis humana. Después de 15 a 45 min de agitación, un volumen de la llamada "vacuna intermedia" se añade y se mezcla durante 15-45 min. Luego se añade PBS mod 20 x concentrado (NaCl 2,74 M, KCl 54 mM, Na₂HPO₄ 142,8 mM, KH₂PO₄ 26 mM, pH 6,8) y se mezcla durante 15 a 45 min. Este PBS mod 20 x concentrado tiene la misma composición que la emulsión AS03 y la cantidad añadida es función de la dosis de AS03 y se calcula para mantener la composición iónica de la vacuna constante mientras que se reduce el contenido de emulsión. Finalmente se añade la cantidad requerida de emulsión (31,25 ó 62,5 ó 125 ó 250 µl / dosis) y se mezcla durante 15 a 45 min para alcanzar los valores diana finales ilustrados en la Tabla 23.

X.4. Resultados de inmunogenicidad - Respuesta inmunitaria humoral

X.4.1 Títulos medios geométricos (GMT) de HI

Los GMT para anticuerpos de HI con IC del 95% se muestran en la Tabla 24 y la Figura 15. Los GMT para anticuerpos de HI con 95% por grupo de edad (18-49 años y 50-64 años) se muestran en la Tabla 25.

Tabla 24 - Tasas de seropositividad y GMT para título de anticuerpos de HI en el día 0 y día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

| Anticuerpo | Grupo | Momento | N | >= 10 1/DIL | | | | GMT | | | | |
|------------|-------------|----------|-----|-------------|------|------------|------|--------------|--------------|-------|-------|---------|
| | | | | n | % | IC del 95% | | Valor | IC del 95% | | Mín | Máx |
| | | | | | | LI | LS | | LI | LS | | |
| A/Salomón | FluLD11 | PRE | 187 | 94 | 50,3 | 42,9 | 57,6 | 13,0 | 10,9 | 15,5 | <10,0 | 905,0 |
| | | PI (D21) | 187 | 187 | 100 | 98,0 | 100 | 203,2 | 171,7 | 240,3 | 10,0 | 5120,0 |
| | FluLD12 | PRE | 189 | 83 | 43,9 | 36,7 | 51,3 | 12,3 | 10,2 | 14,8 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 189 | 185 | 97,9 | 94,7 | 99,4 | 155,8 | 128,2 | 189,4 | <10,0 | 2560,0 |
| | FluLD14 | PRE | 190 | 84 | 44,2 | 37,0 | 51,6 | 12,9 | 10,6 | 15,8 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 190 | 186 | 97,9 | 94,7 | 99,4 | 164,9 | 137,6 | 197,8 | <10,0 | 2560,0 |
| | FluLD18 | PRE | 192 | 100 | 52,1 | 44,8 | 59,3 | 14,9 | 12,3 | 18,2 | <10,0 | 640,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 187 | 97,4 | 94,0 | 99,1 | 151,1 | 124,7 | 183,1 | <10,0 | 3620,0 |
| | Fluarix | PRE | 185 | 106 | 57,3 | 49,8 | 64,5 | 15,1 | 12,5 | 18,2 | <10,0 | 640,0 |
| | | PI (D21) | 185 | 183 | 98,9 | 96,1 | 99,9 | 191,0 | 158,5 | 230,2 | <10,0 | 3620,0 |
| | | PRE | 187 | 142 | 75,9 | 69,2 | 81,9 | 29,4 | 23,8 | 36,4 | <10,0 | 1280,0 |
| | A/Wisconsin | FluLD11 | PRE | 187 | 187 | 100 | 98,0 | 100 | 380,1 | 321,3 | 449,8 | 14,0 |
| PI (D21) | | | 187 | 187 | 100 | 98,0 | 100 | 326,4 | 275,6 | 386,7 | <10,0 | 5120,0 |
| FluLD12 | | PRE | 189 | 141 | 74,6 | 67,8 | 80,6 | 30,0 | 24,3 | 37,2 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 189 | 188 | 99,5 | 97,1 | 100 | 319,9 | 270,0 | 379,1 | <10,0 | 20480,0 |
| FluLD14 | | PRE | 190 | 141 | 74,2 | 67,4 | 80,3 | 29,9 | 24,5 | 36,5 | <10,0 | 640,0 |
| | | PI (D21) | 190 | 188 | 98,9 | 96,2 | 99,9 | 319,9 | 270,0 | 379,1 | <10,0 | 20480,0 |
| FluLD18 | | PRE | 192 | 149 | 77,6 | 71,0 | 83,3 | 27,2 | 22,6 | 32,8 | <10,0 | 905,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 191 | 99,5 | 97,1 | 100 | 273,9 | 232,0 | 323,3 | <10,0 | 5120,0 |
| Fluarix | | PRE | 185 | 155 | 83,8 | 77,7 | 88,8 | 37,4 | 30,2 | 46,4 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 185 | 185 | 100 | 98,0 | 100 | 335,3 | 286,2 | 392,7 | 20,0 | 5120,0 |

(continuación)

| | | >= 10 1/DIL | | | | GMT | | | | | | |
|------------|---------|-------------|-----|-----|------|------------|------|-------|------------|-------|-------|--------|
| Anticuerpo | Grupo | Momento | N | n | % | IC del 95% | | Valor | IC del 95% | | Mín | Máx |
| | | | | | | LI | LS | | LI | LS | | |
| B/Malasia | FluLD11 | PRE | 187 | 142 | 75,9 | 69,2 | 81,9 | 25,8 | 21,3 | 31,3 | <10,0 | 2560,0 |
| | | PI (D21) | 187 | 187 | 100 | 98,0 | 100 | 225,8 | 195,3 | 261,1 | 20,0 | 2560,0 |
| | FluLD12 | PRE | 189 | 145 | 76,7 | 70,0 | 82,5 | 27,3 | 22,6 | 32,9 | <10,0 | 3620,0 |
| | | PI (D21) | 189 | 188 | 99,5 | 97,1 | 100 | 246,1 | 210,9 | 287,2 | <10,0 | 3620,0 |
| | FluLD14 | PRE | 190 | 138 | 72,6 | 65,7 | 78,8 | 22,6 | 18,8 | 27,1 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 190 | 188 | 98,9 | 96,2 | 99,9 | 195,5 | 165,1 | 231,4 | <10,0 | 2560,0 |
| | FluLD18 | PRE | 192 | 142 | 74,0 | 67,1 | 80,0 | 23,2 | 19,5 | 27,8 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 188 | 97,9 | 94,8 | 99,4 | 171,2 | 144,2 | 203,2 | <10,0 | 5120,0 |
| | Fluarix | PRE | 185 | 139 | 75,1 | 68,3 | 81,2 | 27,0 | 22,2 | 32,7 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 185 | 183 | 98,9 | 96,1 | 99,9 | 217,8 | 184,3 | 257,4 | <10,0 | 3620,0 |

FluLD11 = 5 µg de HA/cepa con 1/1 de dosis de AS03; FluLD12 = 5 µg de HA/cepa con 1/2 de dosis de AS03; FluLD14 = 5 µg de HA/cepa con 1/4 de dosis de AS03; FluLD18 = 5 µg de HA/cepa con 1/8 de dosis AS03; Fluarix = Fluarix (15 µg de HA/cepa)

N = Número de sujetos con resultados disponibles
n/% = Número/porcentaje de sujetos seropositivos (título de HI>=1:10)
IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior
GMT = Título de anticuerpos medio geométrico; PRE = Antes de la vacunación en el día 0; Mín/Máx= Mínimo/máximo
PI (D21) = Después de la vacunación en el día 21

Tabla 25 - Tasas de seropositividad y GMT para título de anticuerpos de HI en D0 y d21 por categoría de edad

| Anticuerpo | Subgrupo | Grupo | Momento | N | >= 10 1/DIL | | | | GMT | | | | |
|------------|------------|---------|----------|------|-------------|------|-------|-------|-------|-------|--------|------------|--------|
| | | | | | n | % | LI | LS | Valor | LI | LS | IC del 95% | |
| | | | | | IC del 95% | | | | | | | | |
| A/Salomón | 18-49 años | FluLD11 | PRE | 129 | 68 | 52,7 | 43,7 | 61,6 | 14,7 | 11,7 | 18,5 | <10,0 | 905,0 |
| | | | PI (D21) | 129 | 129 | 100 | 97,2 | 100 | 271,6 | 224,5 | 328,5 | 10,0 | 5120,0 |
| | | FluLD12 | PRE | 128 | 58 | 45,3 | 36,5 | 54,3 | 14,1 | 11,0 | 18,0 | <10,0 | 1280,0 |
| | | | PI (D21) | 128 | 125 | 97,7 | 93,3 | 99,5 | 195,4 | 153,3 | 249,0 | <10,0 | 2560,0 |
| | | FluLD14 | PRE | 130 | 62 | 47,7 | 38,9 | 56,6 | 15,3 | 11,7 | 20,0 | <10,0 | 1280,0 |
| | | | PI (D21) | 130 | 128 | 98,5 | 94,6 | 99,8 | 205,5 | 167,0 | 252,8 | <10,0 | 2560,0 |
| | | FluLD18 | PRE | 132 | 73 | 55,3 | 46,4 | 64,0 | 17,2 | 13,4 | 22,0 | <10,0 | 640,0 |
| | PI (D21) | | 132 | 130 | 98,5 | 94,6 | 99,8 | 195,7 | 156,2 | 245,1 | <10,0 | 3620,0 | |
| | 50-64 años | Fluarix | PRE | 130 | 70 | 53,8 | 44,9 | 62,6 | 15,1 | 12,0 | 19,2 | <10,0 | 640,0 |
| | | | PI (D21) | 130 | 128 | 98,5 | 94,6 | 99,8 | 247,6 | 197,7 | 310,0 | <10,0 | 3620,0 |
| | | FluLD11 | PRE | 58 | 26 | 44,8 | 31,7 | 58,5 | 9,9 | 7,8 | 12,5 | <10,0 | 113,0 |
| | | | PI (D21) | 58 | 58 | 100 | 93,8 | 100 | 106,5 | 80,5 | 141,0 | 10,0 | 905,0 |
| | | FluLD12 | PRE | 61 | 25 | 41,0 | 28,6 | 54,3 | 9,3 | 7,4 | 11,8 | <10,0 | 80,0 |
| | | | PI (D21) | 61 | 60 | 98,4 | 91,2 | 100 | 96,9 | 71,9 | 130,8 | <10,0 | 1810,0 |
| FluLD14 | | PRE | 60 | 22 | 36,7 | 24,6 | 50,1 | 9,0 | 7,1 | 11,4 | <10,0 | 160,0 | |
| | PI (D21) | 60 | 58 | 96,7 | 88,5 | 99,6 | 102,5 | 73,2 | 143,4 | <10,0 | 1280,0 | | |
| FluLD18 | PRE | 60 | 27 | 45,0 | 32,1 | 58,4 | 11,0 | 8,1 | 14,8 | <10,0 | 453,0 | | |
| | PI (D21) | 60 | 57 | 95,0 | 86,1 | 99,0 | 85,6 | 61,7 | 118,8 | <10,0 | 1280,0 | | |
| Fluarix | PRE | 55 | 36 | 65,5 | 51,4 | 77,8 | 14,9 | 11,2 | 19,9 | <10,0 | 226,0 | | |
| | PI (D21) | 55 | 55 | 100 | 93,5 | 100 | 103,5 | 77,9 | 137,3 | 20,0 | 2560,0 | | |

(continuación)

| | | >= 10 1/DIL | | | | | GMT | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|------|------|------|------------|-------|-------|------------|--------|--------|---------|
| Anticuerpo | Subgrupo | Grupo | Momento | N | n | % | IC del 95% | | Valor | IC del 95% | | Máx | |
| | | | | | | | LI | LS | | LI | LS | | Min |
| A/Wisconsin | 18-49 años | FluLD11 | PRE | 129 | 98 | 76,0 | 67,7 | 83,1 | 28,7 | 22,2 | 37,1 | <10,0 | 1280,0 |
| | | | PI (D21) | 129 | 129 | 100 | 97,2 | 100 | 360,1 | 294,7 | 440,1 | 14,0 | 5120,0 |
| | | FluLD12 | PRE | 128 | 95 | 74,2 | 65,7 | 81,5 | 31,2 | 23,9 | 40,6 | <10,0 | 1280,0 |
| | | | PI (D21) | 128 | 127 | 99,2 | 95,7 | 100 | 335,0 | 271,4 | 413,4 | <10,0 | 5120,0 |
| | | FluLD14 | PRE | 130 | 99 | 76,2 | 67,9 | 83,2 | 32,1 | 25,2 | 41,0 | <10,0 | 640,0 |
| | | | PI (D21) | 130 | 130 | 100 | 97,2 | 100 | 334,8 | 276,0 | 406,1 | 10,0 | 20480,0 |
| | | FluLD18 | PRE | 132 | 105 | 79,5 | 71,7 | 86,1 | 27,7 | 22,2 | 34,5 | <10,0 | 905,0 |
| | PI (D21) | | 132 | 131 | 99,2 | 95,9 | 100 | 273,2 | 223,8 | 333,6 | <10,0 | 3620,0 | |
| | 50-64 años | Fluarix | PRE | 130 | 106 | 81,5 | 73,8 | 87,8 | 34,0 | 26,6 | 43,4 | <10,0 | 1280,0 |
| | | | PI (D21) | 130 | 130 | 100 | 97,2 | 100 | 360,7 | 299,2 | 434,8 | 20,0 | 5120,0 |
| | | FluLD11 | PRE | 58 | 44 | 75,9 | 62,8 | 86,1 | 31,1 | 20,9 | 46,4 | <10,0 | 1280,0 |
| | | | PI (D21) | 58 | 58 | 100 | 93,8 | 100 | 428,8 | 312,7 | 587,9 | 20,0 | 2560,0 |
| | | FluLD12 | PRE | 61 | 46 | 75,4 | 62,7 | 85,5 | 27,8 | 19,2 | 40,2 | <10,0 | 640,0 |
| | | | PI (DIA 21) | 61 | 61 | 100 | 94,1 | 100 | 309,2 | 231,0 | 413,9 | 20,0 | 5120,0 |
| FluLD14 | | PRE | 60 | 42 | 70,0 | 56,8 | 81,2 | 25,6 | 17,9 | 36,6 | <10,0 | 640,0 | |
| | PI (D21) | 60 | 58 | 96,7 | 88,5 | 99,6 | 290,0 | 205,5 | 409,1 | <10,0 | 2560,0 | | |
| FluLD18 | PRE | 60 | 44 | 73,3 | 60,3 | 83,9 | 26,2 | 18,3 | 37,6 | <10,0 | 640,0 | | |
| | PI (D21) | 60 | 60 | 100 | 94,0 | 100 | 275,3 | 202,4 | 374,4 | 10,0 | 5120,0 | | |
| | Fluarix | PRE | 55 | 49 | 89,1 | 77,8 | 95,9 | 47,1 | 30,4 | 72,9 | <10,0 | 1280,0 | |
| | | | PI (D21) | 55 | 55 | 100 | 93,5 | 100 | 282,0 | 208,9 | 380,6 | 40,0 | 2560,0 |

(continuación)

| | | >= 10 1/DIL | | | | GMT | | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-----------|------|------|------|------------|-------|-------|------------|--------|-------|--------|
| Anticuerpo | Subgrupo | Grupo | Momento | N | n | % | IC del 95% | | Valor | IC del 95% | | Mín | Máx |
| | | | | | | | LI | LS | | LI | LS | | |
| B/Malasia | 18-49 años | FluLD11 | PRE | 129 | 101 | 78,3 | 70,2 | 85,1 | 26,3 | 20,8 | 33,4 | <10,0 | 2560,0 |
| | | | PI (D21) | 129 | 129 | 100 | 97,2 | 100 | 281,2 | 237,9 | 332,4 | 40,0 | 2560,0 |
| | | FluLD12 | PRE | 128 | 98 | 76,6 | 68,3 | 83,6 | 27,2 | 21,5 | 34,4 | <10,0 | 3620,0 |
| | | | PI (D21) | 128 | 128 | 100 | 97,2 | 100 | 335,9 | 283,3 | 398,3 | 28,0 | 3620,0 |
| | | FluLD14 | PRE | 130 | 94 | 72,3 | 63,8 | 79,8 | 22,7 | 18,2 | 28,2 | <10,0 | 640,0 |
| | | | PI (D21) | 130 | 128 | 98,5 | 94,6 | 99,8 | 219,1 | 179,8 | 266,9 | <10,0 | 2560,0 |
| | 50-64 años | FluLD18 | PRE | 132 | 95 | 72,0 | 63,5 | 79,4 | 23,9 | 19,1 | 30,0 | <10,0 | 1280,0 |
| | | | PI (D21) | 132 | 130 | 98,5 | 94,6 | 99,8 | 203,5 | 166,7 | 248,5 | <10,0 | 5120,0 |
| | | Fluarix | PRE | 130 | 98 | 75,4 | 67,1 | 82,5 | 27,4 | 21,7 | 34,4 | <10,0 | 453,0 |
| | | | PI (D21) | 130 | 129 | 99,2 | 95,8 | 100 | 250,9 | 206,9 | 304,3 | <10,0 | 2560,0 |
| | | FluLD11 | PRE | 58 | 41 | 70,7 | 57,3 | 81,9 | 24,8 | 17,7 | 34,7 | <10,0 | 320,0 |
| | | | PI (D21) | 58 | 58 | 100 | 93,8 | 100 | 138,6 | 108,1 | 177,6 | 20,0 | 1280,0 |
| | FluLD12 | PRE | PRE | 61 | 47 | 77,0 | 64,5 | 86,8 | 27,5 | 19,9 | 37,8 | <10,0 | 640,0 |
| | | | PI (D21) | 61 | 60 | 98,4 | 91,2 | 100 | 128,1 | 99,3 | 165,1 | <10,0 | 1280,0 |
| | | FluLD14 | PRE | 60 | 44 | 73,3 | 60,3 | 83,9 | 22,4 | 15,9 | 31,6 | <10,0 | 1280,0 |
| | | | PI (D21) | 60 | 60 | 100 | 94,0 | 100 | 152,7 | 110,9 | 210,3 | 10,0 | 2560,0 |
| | | FluLD18 | PRE | 60 | 47 | 78,3 | 65,8 | 87,9 | 21,8 | 16,2 | 29,2 | <10,0 | 453,0 |
| | | | PI (D21) | 60 | 58 | 96,7 | 88,5 | 99,6 | 117,0 | 85,4 | 160,3 | <10,0 | 1810,0 |
| Fluarix | PRE | 55 | 41 | 74,5 | 61,0 | 85,3 | 26,0 | 18,0 | 37,6 | <10,0 | 1280,0 | | |
| | PI (D21) | 55 | 54 | 98,2 | 90,3 | 100 | 155,9 | 113,0 | 215,0 | <10,0 | 3620,0 | | |

Conclusión intermedia

5 Para A/Islas Salomón (H1N1), los GMT estuvieron en el mismo intervalo para todos los grupos del estudio. Todos los grupos adyuvantados son no inferiores al grupo de Fluarix para todas las cepas y todas las categorías de edad. Para A/Wisconsin (H3N2) se mostró una tendencia a una respuesta inmunitaria disminuida con concentración de AS03 decreciente sin diferencia estadísticamente significativa. Para B/Malasia también se mostró una tendencia a una respuesta inmunitaria disminuida con concentración de AS03 decreciente, pero la única diferencia estadísticamente significativa se mostró entre GMT inducidos con FluLD1/2 y FluLD1/8 para esta cepa (véase la Figura 15).

10 Se observaron resultados similares cuando los datos se analizaron por grupo de edad. Sin embargo, para B/Malasia, el GMT inducido con FluLD1/2 fue estadísticamente significativamente superior a con FluLD1/4 en el grupo de edad más joven (18-49 años).

X.4.2 Factores de seroconversión de títulos de anticuerpos anti-HI, tasas de seroprotección y tasas de seroconversión (establece una correlación de la protección como se establece para la vacuna contra la gripe en seres humanos)

15 Los resultados se presentan en las Tablas 26 y 26 - Figura 16 para tasas de seroprotección, Tablas 28 y 29 - Figura 17A y 17B para tasas de seroconversión y Tablas 30 y 31 - Figura 17 para factores de conversión.

Tabla 26 - Tasas de seroprotección (SPR) para título de anticuerpos de HI en D0 y D21

| | | | | SPR | | | | |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|------|------|------|------|
| | | | | IC del 95% | | | | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS | |
| A/Salomón | FluLD11 | PRE | 187 | 45 | 24,1 | 18,1 | 30,8 | |
| | | PI (DÍA21) | 187 | 177 | 94,7 | 90,4 | 97,4 | |
| | FluLD12 | PRE | 189 | 46 | 24,3 | 18,4 | 31,1 | |
| | | PI (DÍA21) | 189 | 170 | 89,9 | 84,7 | 93,8 | |
| | FluLD14 | PRE | 190 | 43 | 22,6 | 16,9 | 29,2 | |
| | | PI (DÍA21) | 190 | 169 | 88,9 | 83,6 | 93,0 | |
| | FluLD18 | PRE | 192 | 52 | 27,1 | 20,9 | 34,0 | |
| | | PI (DÍA21) | 192 | 166 | 86,5 | 80,8 | 91,0 | |
| | Fluarix | PRE | 185 | 50 | 27,0 | 20,8 | 34,0 | |
| | | PI (DÍA21) | 185 | 172 | 93,0 | 88,3 | 96,2 | |
| | A/Wisconsin | FluLD11 | PRE | 187 | 90 | 48,1 | 40,8 | 55,5 |
| | | | PI (DÍA21) | 187 | 183 | 97,9 | 94,6 | 99,4 |
| Fluid12 | | PRE | 189 | 90 | 47,6 | 40,3 | 55,0 | |
| | | PI (DÍA21) | 189 | 186 | 98,4 | 95,4 | 99,7 | |
| FluL14 | | PRE | 190 | 96 | 50,5 | 43,2 | 57,8 | |
| | | PI (DÍA21) | 190 | 185 | 97,4 | 94,0 | 99,1 | |
| FluLD18 | | PRE | 192 | 91 | 47,4 | 40,2 | 54,7 | |
| | | PI (DÍA21) | 192 | 184 | 95,8 | 92,0 | 98,2 | |
| Fluarix | | PRE | 185 | 95 | 51,4 | 43,9 | 58,8 | |
| | | PI (DÍA21) | 185 | 183 | 98,9 | 96,1 | 99,9 | |

ES 2 377 761 T3

(continuación)

| | | | | SPR | | | |
|-------------------|------------|------------|-----|------|------|------------|------|
| | | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| B/Malasia | FluLD11 | PRE | 187 | 80 | 42,8 | 35,6 | 50,2 |
| | | PI (DÍA21) | 187 | 183 | 97,9 | 94,6 | 99,4 |
| | FluLD12 | PRE | 189 | 88 | 46,6 | 39,3 | 53,9 |
| | | PI (DÍA21) | 189 | 186 | 98,4 | 95,4 | 99,7 |
| | FluLD14 | PRE | 190 | 81 | 42,6 | 35,5 | 50,0 |
| | | PI (DÍA21) | 190 | 180 | 94,7 | 90,5 | 97,4 |
| | FluLD18 | PRE | 192 | 86 | 44,8 | 37,6 | 52,1 |
| | | PI (DÍA21) | 192 | 180 | 93,8 | 89,3 | 96,7 |
| Fluarix | PRE | 185 | 88 | 47,6 | 40,2 | 55,0 | |
| | PI (DÍA21) | 185 | 178 | 96,2 | 92,4 | 98,5 | |

FluLD11 = 5 µg de HA/cepa con 1/1 de dosis de AS03
 FluLD21 = 5 µg de HA/cepa con 1/2 de dosis de AS03
 FluLD14 = 5 µg de HA/cepa con 1/4 de dosis de AS03
 FluLD18 = 5 µg de HA/cepa con 1/8 de dosis de AS03
 Fluarix = Fluarix (15 µg de HA/cepa)

Tasa de seroprotección definida como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero \geq 1:40

N = Número de sujetos con resultados disponibles antes y después de la vacunación

n/% = Número/porcentaje de sujetos seroprotectidos

IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior

PRE = Antes de la vacunación en el día 0; PI (DÍA21) = Después de la vacunación en el día 21

Tabla 27 - Tasas de seroprotección (SPR) para título de anticuerpos de HI en D0 y D21 por categoría de edad

| Cepa de la vacuna | Subgrupo | Grupo | Momento | N | SPR | | | | |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------|------|------------|------|------|
| | | | | | n | % | IC del 95% | | |
| | | | | | | | LI | LS | |
| A/Salomón | 18-49 años | FluLD11 | PRE | 129 | 36 | 27,9 | 20,4 | 36,5 | |
| | | | PI (DÍA21) | 129 | 127 | 98,4 | 94,5 | 99,8 | |
| | | Fluid12 | PRE | 128 | 35 | 27,3 | 19,8 | 35,9 | |
| | | | PI (DÍA21) | 128 | 117 | 91,4 | 85,1 | 95,6 | |
| | | FluLD14 | PRE | 130 | 35 | 26,9 | 19,5 | 35,4 | |
| | | | PI (DÍA21) | 130 | 119 | 91,5 | 85,4 | 95,7 | |
| | | FluLD18 | PRE | 132 | 43 | 32,6 | 24,7 | 41,3 | |
| | | | PI (DÍA21) | 132 | 119 | 90,2 | 83,7 | 94,7 | |
| | | Fluarix | PRE | 130 | 34 | 26,2 | 18,8 | 34,6 | |
| | | | PI (DÍA21) | 130 | 124 | 95,4 | 90,2 | 98,3 | |
| | | 50-64 años | FluLD11 | PRE | 58 | 9 | 15,5 | 7,3 | 27,4 |
| | | | | PI (DÍA21) | 58 | 50 | 86,2 | 74,6 | 93,9 |
| | FluLD12 | | PRE | 61 | 11 | 18,0 | 9,4 | 30,0 | |
| | | | PI (DÍA21) | 61 | 53 | 86,9 | 75,8 | 94,2 | |
| | FluLD14 | | PRE | 60 | 8 | 13,3 | 5,9 | 24,6 | |
| | | | PI (DÍA21) | 60 | 50 | 83,3 | 71,5 | 91,7 | |
| | FluLD18 | | PRE | 60 | 9 | 15,0 | 7,1 | 26,6 | |
| | | | PI (DÍA21) | 60 | 47 | 78,3 | 65,8 | 87,9 | |
| | Fluarix | PRE | 55 | 16 | 29,1 | 17,6 | 42,9 | | |
| | | PI (DÍA21) | 55 | 48 | 87,3 | 75,5 | 94,7 | | |

ES 2 377 761 T3

(continuación)

| | | | | | SPR | | | |
|-------------------|------------|---------|------------|-----|-----|------|------------|------|
| | | | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Subgrupo | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| A/Wisconsin | 18-49 años | Fluid11 | PRE | 129 | 62 | 48,1 | 39,2 | 57,0 |
| | | | PI (DÍA21) | 129 | 127 | 98,4 | 94,5 | 99,8 |
| | | FluLD12 | PRE | 128 | 62 | 48,4 | 39,5 | 57,4 |
| | | | PI (DÍA21) | 128 | 126 | 98,4 | 94,5 | 99,8 |
| | | FluLD14 | PRE | 130 | 68 | 52,3 | 43,4 | 61,1 |
| | | | PI (DÍA21) | 130 | 128 | 98,5 | 94,6 | 99,8 |
| | | FluLD18 | PRE | 132 | 62 | 47,0 | 38,2 | 55,8 |
| | | | PI (DÍA21) | 132 | 127 | 96,2 | 91,4 | 98,8 |
| | | Fluarix | PRE | 130 | 66 | 50,8 | 41,9 | 59,6 |
| | | | PI (DÍA21) | 130 | 128 | 98,5 | 94,6 | 99,8 |
| | 50-64 años | FluLD11 | PRE | 58 | 28 | 48,3 | 35,0 | 61,8 |
| | | | PI (DÍA21) | 58 | 56 | 96,6 | 88,1 | 99,6 |
| | | FluLD12 | PRE | 61 | 28 | 45,9 | 33,1 | 59,2 |
| | | | PI (DÍA21) | 61 | 60 | 98,4 | 91,2 | 100 |
| | | FluLD14 | PRE | 60 | 28 | 46,7 | 33,7 | 60,0 |
| | | | PI (DÍA21) | 60 | 57 | 95,0 | 86,1 | 99,0 |
| | | FluLD18 | PRE | 60 | 29 | 48,3 | 35,2 | 61,6 |
| | | | PI (DÍA21) | 60 | 57 | 95,0 | 86,1 | 99,0 |
| | | Fluarix | PRE | 55 | 29 | 52,7 | 38,8 | 66,3 |
| | | | PI (DÍA21) | 55 | 55 | 100 | 93,5 | 100 |
| B/Malasia | 18-49 años | FluLD11 | PRE | 129 | 53 | 41,1 | 32,5 | 50,1 |
| | | | PI (DÍA21) | 129 | 129 | 100 | 97,2 | 100 |
| | | FluLD12 | PRE | 128 | 59 | 46,1 | 37,2 | 55,1 |
| | | | PI (DÍA21) | 128 | 127 | 99,2 | 95,7 | 100 |
| | | FluLD14 | PRE | 130 | 57 | 43,8 | 35,2 | 52,8 |
| | | | PI (DÍA21) | 130 | 125 | 96,2 | 91,3 | 98,7 |
| | | FluLD18 | PRE | 132 | 61 | 46,2 | 37,5 | 55,1 |
| | | | PI (DÍA21) | 132 | 128 | 97,0 | 92,4 | 99,2 |
| | | Fluarix | PRE | 130 | 61 | 46,9 | 38,1 | 55,9 |
| | | | PI (DÍA21) | 130 | 126 | 96,9 | 92,3 | 99,2 |
| | 50-64 años | FluLD11 | PRE | 58 | 27 | 46,6 | 33,3 | 60,1 |

(continuación)

| | | | | | SPR | | | | |
|-------------------|----------|---------|-------------|------------|-----|------|------------|------|------|
| | | | | | | | IC del 95% | | |
| Cepa de la vacuna | Subgrupo | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS | |
| | | | PI (DÍA21) | 58 | 54 | 93,1 | 83,3 | 98,1 | |
| | | | FluLD12 | PRE | 61 | 29 | 47,5 | 34,6 | 60,7 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 61 | 59 | 96,7 | 88,7 | 99,6 | |
| | | | PRE | 60 | 24 | 40,0 | 27,6 | 53,5 | |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 60 | 55 | 91,7 | 81,6 | 97,2 | |
| | | | PRE | 60 | 25 | 41,7 | 29,1 | 55,1 | |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 60 | 52 | 86,7 | 75,4 | 94,1 | |
| | | | PRE | 55 | 27 | 49,1 | 35,4 | 62,9 | |
| | | | | PI (DÍA21) | 55 | 52 | 94,5 | 84,9 | 98,9 |

Misma leyenda que en la Tabla 24

Conclusión intermedia

La SPR cumple los criterios del CHMP (media > 70) y de la FDA (LI del IC del 95% > 70) para todos los grupos y las tres cepas. Se mostró que la SPR estaba dentro del mismo intervalo para todos los grupos.

5 **Tabla 28 - Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA21)**

| | | | | SCR | | | |
|-------------------|---------|------------|-----|-----|------|------------|------|
| | | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| A/Salomón | FluLD11 | PI (DÍA21) | 187 | 154 | 82,4 | 76,1 | 87,5 |
| | FluLD12 | PI (DÍA21) | 189 | 141 | 74,6 | 67,8 | 80,6 |
| | FluLD14 | PI (DÍA21) | 190 | 133 | 70,0 | 62,9 | 76,4 |
| | FluLD18 | PI (DÍA21) | 192 | 119 | 62,0 | 54,7 | 68,9 |
| | Fluarix | PI (DÍA21) | 185 | 131 | 70,8 | 63,7 | 77,2 |
| A/Wisconsin | FluLD11 | PI (DÍA21) | 187 | 150 | 80,2 | 73,8 | 85,7 |
| | FluLD12 | PI (DÍA21) | 189 | 147 | 77,8 | 71,2 | 83,5 |
| | FluLD14 | PI (DÍA21) | 190 | 142 | 74,7 | 67,9 | 80,7 |
| | FluLD18 | PI (DÍA21) | 192 | 142 | 74,0 | 67,1 | 80,0 |
| | Fluarix | PI (DÍA21) | 185 | 118 | 63,8 | 56,4 | 70,7 |
| B/Malasia | FluLD11 | PI (DÍA21) | 187 | 136 | 72,7 | 65,7 | 79,0 |
| | FluLD12 | PI (DÍA21) | 189 | 127 | 67,2 | 60,0 | 73,8 |
| | FluLD14 | PI (DÍA21) | 190 | 128 | 67,4 | 60,2 | 74,0 |

ES 2 377 761 T3

(continuación)

| | | | | SCR | | | |
|-------------------|---------|------------|-----|------------|------|------|------|
| | | | | IC del 95% | | | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| | FluLD18 | PI (DÍA21) | 192 | 127 | 66,1 | 59,0 | 72,8 |
| | Fluarix | PI (DÍA21) | 185 | 125 | 67,6 | 60,3 | 74,3 |

FluLD11 = 5 µg de HA/cepa con 1/1 de dosis de AS03; FluLD12 = 5 µg de HA/cepa con 1/2 de dosis de AS03; FluLD14 = 5 µg de HA/cepa con 1/4 de dosis de AS03; FluLD18 = 5 µg de HA/cepa con 1/8 de dosis de AS03; Fluarix = Fluarix (15 µg de HA/cepa)

Seroconversión definida como:

Para sujetos inicialmente seronegativos, título de anticuerpos ≥ 40 1/DIL después de la vacunación

Para sujetos inicialmente seropositivos, título de anticuerpos después de la vacunación ≥ 4 veces el título de anticuerpos antes de la vacunación

N = Número de sujetos con resultados disponibles antes y después de la vacunación

n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos

IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior

PI (DÍA21)= Después de la vacunación en el día 21

Tabla 29 - Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA21) por categoría de edad

| | | | | | SCR | | | |
|-------------------|------------|---------|------------|-----|------------|------|------|------|
| | | | | | IC del 95% | | | |
| Cepa de la vacuna | Subgrupo | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| A/Salomón | 18-49 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 129 | 113 | 87,6 | 80,6 | 92,7 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 128 | 96 | 75,0 | 66,6 | 82,2 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 130 | 91 | 70,0 | 61,3 | 77,7 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 132 | 84 | 63,6 | 54,8 | 71,8 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 130 | 101 | 77,7 | 69,6 | 84,5 |
| | 50-64 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 58 | 41 | 70,7 | 57,3 | 81,9 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 61 | 45 | 73,8 | 60,9 | 84,2 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 60 | 42 | 70,0 | 56,8 | 81,2 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 60 | 35 | 58,3 | 44,9 | 70,9 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 55 | 30 | 54,5 | 40,6 | 68,0 |
| A/Wisconsin | 18-49 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 129 | 104 | 80,6 | 72,7 | 87,0 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 128 | 101 | 78,9 | 70,8 | 85,6 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 130 | 97 | 74,6 | 66,2 | 81,8 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 132 | 96 | 72,7 | 64,3 | 80,1 |

(continuación)

| | | | | | SCR | | | |
|------------------------------------|------------|---------|------------|-----|-----|------|------------|------|
| | | | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Subgrupo | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| | 50-64 años | Fluarix | PI (DÍA21) | 130 | 89 | 68,5 | 59,7 | 76,3 |
| | | FluLD11 | PI (DÍA21) | 58 | 46 | 79,3 | 66,6 | 88,8 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 61 | 46 | 75,4 | 62,7 | 85,5 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 60 | 45 | 75,0 | 62,1 | 85,3 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 60 | 46 | 76,7 | 64,0 | 86,6 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 55 | 29 | 52,7 | 38,8 | 66,3 |
| B/Malasia | 18-49 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 129 | 102 | 79,1 | 71,0 | 85,7 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 128 | 96 | 75,0 | 66,6 | 82,2 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 130 | 93 | 71,5 | 63,0 | 79,1 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 132 | 96 | 72,7 | 64,3 | 80,1 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 130 | 94 | 72,3 | 63,8 | 79,8 |
| | 50-64 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 58 | 34 | 58,6 | 44,9 | 71,4 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 61 | 31 | 50,8 | 37,7 | 63,9 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 60 | 35 | 58,3 | 44,9 | 70,9 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 60 | 31 | 51,7 | 38,4 | 64,8 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 55 | 31 | 56,4 | 42,3 | 69,7 |
| Misma leyenda que para la Tabla 26 | | | | | | | | |

Conclusión intermedia

5 La SPR cumple los criterios del CHMP (media > 40) y de la FDA (LI del IC del 95% > 40) para todas las vacunas del estudio y para las 3 cepas. Se mostró una tendencia a una SCR disminuida con contenido de AS03 disminuido, excepto para B/Malasia (en la que se mostró que todos los resultados estaban dentro del mismo intervalo). Para A/Islands Salomón, FluLD1/1 indujo una SCR estadísticamente significativamente mayor en comparación con FluLDI/8. Para todos los grupos, las SCR inducidas por FluLDI/2 y FluLD1/4 estuvieron dentro del mismo intervalo.

Tabla 30 - Factor de seroconversión (SCF) para título de anticuerpos de HI en D21

| | | | | SCF | | |
|---------------------|---------|------------|-----|-------|------------|------|
| | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | Valor | LI | LS |
| A/Salomón (1/DIL) | FluLD11 | PI (DÍA21) | 187 | 15,6 | 12,7 | 19,2 |
| | FluLD12 | PI (DÍA21) | 189 | 12,7 | 10,2 | 15,8 |
| | FluLD14 | PI (DÍA21) | 190 | 12,8 | 10,1 | 16,1 |
| | FluLD18 | PI (DÍA21) | 192 | 10,1 | 8,0 | 12,8 |
| | Fluarix | PI (DÍA21) | 185 | 12,7 | 9,9 | 16,2 |
| A/Wisconsin (1/DIL) | FluLD11 | PI (DÍA21) | 187 | 12,9 | 10,5 | 16,0 |
| | FluLD12 | PI (DÍA21) | 189 | 10,9 | 8,9 | 13,3 |
| | FluLD14 | PI (DÍA21) | 190 | 10,7 | 8,6 | 13,2 |
| | FluLD18 | PI (DÍA21) | 192 | 10,1 | 8,2 | 12,3 |
| | Fluarix | PI (DÍA21) | 185 | 9,0 | 7,2 | 11,2 |
| B/Malasia (1/DIL) | FluLD11 | PI (DÍA21) | 187 | 8,7 | 7,2 | 10,6 |
| | FluLD12 | PI (DÍA21) | 189 | 9,0 | 7,3 | 11,2 |
| | FluLD14 | PI (DÍA21) | 190 | 8,7 | 7,0 | 10,8 |
| | FluLD18 | PI (DÍA21) | 192 | 7,4 | 6,1 | 8,9 |
| | Fluarix | PI (DÍA21) | 185 | 8,1 | 6,6 | 9,9 |

FluLD11 = 5 µg de HA/cepa con 1/1 de dosis de AS03; FluLD12 = 5 µg de HA/cepa con 1/2 de dosis de AS03; FluLD14 = 5 µg de HA/cepa con 1/4 de dosis de AS03; FluLD18 = 5 µg de HA/cepa con 1/8 de dosis de AS03; Fluarix = Fluarix (15 µg de HA/cepa)

N = Número de sujetos con resultados disponibles antes y después de la vacunación

SCF = Factor de seroconversión o relación media geométrica (media[log10(DESPUÉS/ANTES)])

IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior

PI (DÍA21)= Después de la vacunación en el día 21

Tabla 31 - Factor de seroconversión (SCF) para título de anticuerpos de HI en D21 por categoría de edad

| | | | | | SCF | | |
|----------------------------------|------------|---------|------------|-----|-------|------------|------|
| | | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Subgrupo | Grupo | Momento | N | Valor | LI | LS |
| A/Salomón (1/DIL) | 18-49 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 129 | 18,5 | 14,3 | 23,8 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 128 | 13,9 | 10,5 | 18,4 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 130 | 13,4 | 10,1 | 17,8 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 132 | 11,4 | 8,4 | 15,4 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 130 | 16,3 | 12,1 | 22,1 |
| | 50-64 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 58 | 10,8 | 7,7 | 15,1 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 61 | 10,4 | 7,4 | 14,6 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 60 | 11,4 | 7,7 | 17,1 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 60 | 7,8 | 5,5 | 11,2 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 55 | 6,9 | 4,6 | 10,4 |
| A/Wisconsin (1/DIL) | 18-49 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 129 | 12,5 | 9,8 | 16,0 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 128 | 10,7 | 8,5 | 13,7 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 130 | 10,4 | 8,0 | 13,5 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 132 | 9,9 | 7,8 | 12,5 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 130 | 10,6 | 8,2 | 13,8 |
| | 50-64 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 58 | 13,8 | 9,0 | 21,2 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 61 | 11,1 | 7,5 | 16,4 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 60 | 11,3 | 7,7 | 16,7 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 60 | 10,5 | 7,0 | 15,7 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 55 | 6,0 | 4,0 | 8,9 |
| B/Malasia (1/DIL) | 18-49 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 129 | 10,7 | 8,4 | 13,5 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 128 | 12,4 | 9,5 | 16,1 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 130 | 9,7 | 7,4 | 12,6 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 132 | 8,5 | 6,8 | 10,7 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 130 | 9,2 | 7,2 | 11,7 |
| | 50-64 años | FluLD11 | PI (DÍA21) | 58 | 5,6 | 4,0 | 7,7 |
| | | FluLD12 | PI (DÍA21) | 61 | 4,7 | 3,4 | 6,5 |
| | | FluLD14 | PI (DÍA21) | 60 | 6,8 | 4,6 | 10,0 |
| | | FluLD18 | PI (DÍA21) | 60 | 5,4 | 3,8 | 7,5 |
| | | Fluarix | PI (DÍA21) | 55 | 6,0 | 4,1 | 8,8 |
| Misma leyenda que en la Tabla 28 | | | | | | | |

Conclusión intermedia

Para todas las vacunas en estudio, los SCF estuvieron muy por encima de los criterios del CHMP (>2) para las 3 cepas. Los SCF estuvieron dentro del mismo intervalo para todas las vacunas en estudio.

X.4.3 No inferioridad de las vacunas de dosis baja adyuvantadas con respecto a Fluarix (GMT)

- 5 La no inferioridad de las vacunas de dosis baja adyuvantadas con respecto a Fluarix en términos de relaciones de GMT en el día 21 para las 3 cepas víricas se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32 - No inferioridad de las vacunas de dosis baja adyuvantadas con respecto a Fluarix en términos de relaciones de GMT en D21 para las 3 cepas víricas

| | | | Dosis baja contra la gripe | | | | Fluarix | | | |
|--|------------------------|------------|----------------------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|
| | | | IC del 95% | | | | IC del 95% | | | |
| Dosis de AS03 (µl) | Proporción de la dosis | Anticuerpo | N | GMT | LI | LS | N | GMT | LI | LS |
| 250 | 1/1 | A/H1N1 | 187 | 202,3 | 168,3 | 243,2 | 185 | 191,0 | 158,7 | 229,9 |
| | | A/H3N2 | 187 | 378,6 | 320,0 | 447,8 | 185 | 335,3 | 286,5 | 392,3 |
| | | B | 187 | 236,0 | 206,1 | 270,4 | 185 | 217,8 | 184,5 | 257,2 |
| 125 | 1/2 | A/H1N1 | 189 | 160,5 | 135,7 | 189,9 | 185 | 191,0 | 158,7 | 229,9 |
| | | A/H3N2 | 189 | 336,0 | 288,2 | 391,8 | 185 | 335,3 | 286,5 | 392,3 |
| | | B | 189 | 226,2 | 204,8 | 249,7 | 185 | 217,8 | 184,5 | 257,2 |
| 62,5 | 1/4 | A/H1N1 | 190 | 155,5 | 139,2 | 173,7 | 185 | 191,0 | 158,7 | 229,9 |
| | | A/H3N2 | 190 | 302,0 | 272,9 | 334,1 | 185 | 335,3 | 286,5 | 392,3 |
| | | B | 190 | 205,7 | 181,9 | 232,6 | 185 | 217,8 | 184,5 | 257,2 |
| 31,2 | 1/8 | A/H1N1 | 192 | 156,3 | 132,8 | 183,8 | 185 | 191,0 | 158,7 | 229,9 |
| | | A/H3N2 | 192 | 282,9 | 244,0 | 328,1 | 185 | 335,3 | 286,5 | 392,3 |
| | | B | 192 | 169,4 | 145,1 | 197,7 | 185 | 217,8 | 184,5 | 257,2 |
| | | | LD/Fluarix | 90% | | | | | | |
| | | | | | | | CI | | | |
| Dosis de AS03 (µl) | Proporción de la dosis | Anticuerpo | Relación | | LI | LS | | | | |
| 250 | 1/1 | A/H1N1 | 1,06 | | 0,85 | 1,32 | | | | |
| | | A/H3N2 | 1,13 | | 0,93 | 1,37 | | | | |
| | | B | 1,08 | | 0,91 | 1,30 | | | | |
| 125 | 1/2 | A/H1N1 | 0,84 | | 0,68 | 1,04 | | | | |
| | | A/H3N2 | 1,00 | | 0,83 | 1,20 | | | | |
| | | B | 1,04 | | 0,88 | 1,22 | | | | |
| 62,5 | 1/4 | A/H1N1 | 0,81 | | 0,68 | 0,98 | | | | |
| | | A/H3N2 | 0,90 | | 0,77 | 1,05 | | | | |
| | | B | 0,94 | | 0,79 | 1,12 | | | | |
| 31,2 | 1/8 | A/H1N1 | 0,82 | | 0,67 | 1,01 | | | | |
| | | A/H3N2 | 0,84 | | 0,70 | 1,01 | | | | |
| | | B | 0,78 | | 0,64 | 0,94 | | | | |
| N = Número de sujetos con resultados disponibles | | | | | | | | | | |
| IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, IC del 90% = Intervalo de confianza del 90%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior | | | | | | | | | | |
| GMT = Título de anticuerpos medio geométrico | | | | | | | | | | |

Conclusión intermedia

Se mostró que FluLD 1/1, 1/2, 1/4 eran no inferiores a Fluarix en términos de relaciones de GMT para las tres cepas. Se mostró que FluLD 1/8 era no inferior a Fluarix para la cepa H1N1 y H3N2, pero no para B.

X.5. Conclusiones globales

5 X.5.1 Conclusiones de seguridad

Se mostró una mayor reactogenicidad con las vacunas adyuvantadas en comparación con la mostrada con la vacuna comercialmente disponible Fluarix. Para las vacunas adyuvantadas se mostró una tendencia a disminuir la reactogenicidad con una cantidad decreciente de AS03. En conjunto, se obtuvo un perfil de reactogenicidad similar a FluDL1/4 y FluDL1/8.

10 Los síntomas inesperados fueron los mismos para todos los grupos de vacunas.

X.5.2 Conclusiones de inmunogenicidad

El objetivo primario de este estudio fue evaluar la no inferioridad (GMT) de las formulaciones de vacuna de LD frente a Fluarix en D21.

15 En el día 21 después de la vacunación con una dosis de la vacuna adyuvantada FluDL1/1, FluDL1/2 y FluDL1/4 se mostró que las relaciones de GMT para las tres cepas era no inferior a las obtenidas con Fluarix. En ese estudio se mostró que la relación de GMT obtenida con la vacuna FluDL1/8 era no inferior a Fluarix para la cepa H1N1 y H3N2, pero no para la cepa B.

20 A pesar de una tendencia a respuesta inmunitaria decreciente mostrada con cantidades de adyuvante decrecientes, se mostró que todas las vacunas cumplían los 3 criterios del CHMP para la autorización reguladora, para toda las cepas.

Ejemplo XI - Ensayo clínico en una población de +65 años de edad con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe fraccionado y diversos adyuvantes

XI.1. Introducción

25 La eficacia de una vacuna fraccionada contra la gripe clásica tal como Fluarix™ en ancianos adultos es significativamente inferior a la de en una población adulta o joven. Se sugiere que el envejecimiento del sistema inmunitario (es decir, inmunosenescencia) es la causa subyacente de la falta relativa de eficacia observada en ancianos adultos, por tanto, dejando margen para la mejora de las vacunas estimulando respuestas inmunitarias más fuertes. Por tanto, se realizó un estudio de simple ciego aleatorizado controlado de fase II en una población anciana de +65 años de edad en 2007 con el fin de evaluar la inmunogenicidad, seguridad y reactogenicidad de una
30 vacuna candidata contra la gripe con ocho formulaciones de adyuvante diferentes, administrada intramuscularmente, en comparación con Fluarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals) usada como referencia.

Ya se ha probado una vacuna contra la gripe adyuvantada que comprende una emulsión de aceite en agua y 25 µg de 3D-MPL por dosis y demostró ser eficaz (documento WO 2006/100111). En ese estudio, las cantidades de cada componente se fijaron en 250 µl de emulsión de aceite en agua y 25 µg de MPL. El presente estudio tiene como
35 objetivo determinar una formulación de vacuna óptima que equilibre la aceptabilidad del perfil de reactogenicidad/seguridad observado con el del perfil de inmunogenicidad.

XI.2. Diseño del estudio y objetivos

Diez grupos de sujetos (200 por grupo de ≥65 años de edad, excepto para el grupo Fluarix YNG de 18-40 años de edad) recibieron en paralelo las siguientes vacunas contra la gripe i.m.:

- 40
- FluAS03 1/1: vacuna adyuvantada con dosis completa de emulsión o/w (AS03 1/1)
 - FluAS03 1/2: vacuna adyuvantada con 1/2 de dosis de emulsión o/w (AS03 1/2)
 - FluAS03 1/4: vacuna adyuvantada con 1/4 de dosis de emulsión o/w (AS03 1/4)
 - FluAS25 1/1: vacuna adyuvantada con 25 µg MPL + dosis completa de emulsión o/w (AS25A)
 - FluAS25 1/2: vacuna adyuvantada con 25 µg MPL + 1/2 de dosis de emulsión o/w (AS25B)
 - 45 • FluAS25 1/4: vacuna adyuvantada con 25 µg MPL + 1/4 de dosis de emulsión o/w (AS25C)
 - FluAS50 1/2: vacuna adyuvantada con 50 µg MPL + 1/2 de dosis de emulsión o/w (AS25E)

- FluAS50 1/4: vacuna adyuvantada con 50 µg MPL + 1/4 de dosis de emulsión o/w (AS25F)
- Fluarix ELD (≥65 años de edad): Fluarix™
- Fluarix YNG (18-40 años de edad): Fluarix™

5 Programa: una inyección IM de la vacuna contra la gripe en el día 0, recogida de muestra de sangre en el día 0, día 21 y día 180 después de la vacunación. La vacuna contra la gripe fraccionada trivalente convencional Fluarix™ usada en este estudio es la misma que se usó en el Ejemplo X.

Las formulaciones de vacuna se describen en las Tablas 31-32.

XI.2.1. Objetivo primario: inmunogenicidad

10 Identificar una formulación óptima (combinación de una dosificación de emulsión o/w y una dosificación de MPL) de la vacuna contra la gripe adyuvantada en comparación con *Fluarix*, administrada intramuscularmente en sujetos de ≥65 años de edad, basándose en la inmunogenicidad (GMT) para las tres cepas de la vacuna 21 días después de la vacunación. Las variables son como en el Ejemplo X.2.1 y para los sujetos de +65 años de edad (título de anticuerpos de HI y GMT de títulos de HI de anticuerpos en el día 21).

X.2.2. Objetivos secundarios que van a evaluarse:

- 15
- la seguridad y la reactogenicidad en todos los sujetos vacunados con las vacunas contra la gripe
 - la inmunogenicidad (GMT, SCF, SCR y SPR) de las vacunas contra la gripe en todos los sujetos, 21 días después de la vacunación.
 - la persistencia de anticuerpos de HI 180 días después de la primera vacunación, en todos los sujetos.
- 20
- la respuesta inmunitaria mediada por célula (CMI) inducida por las vacunas contra la gripe en términos de frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 específicos de la gripe que producen al menos dos citocinas diferentes (IFN-γ, IL-2, CD40L o TNF-α), en los días 0, 21 y 180 (sólo para un subconjunto de sujetos).

Las variables observadas y derivadas (y definiciones) son como se describen en el Ejemplo X.

XI.3. Composición y administración de vacunas

25 La vacuna contra la gripe adyuvantada se basa en la vacuna comercialmente disponible *Fluarix*, ya comercializada desde 1992 por GSK Bio. Las formulaciones candidatas consisten en los antígenos de la gripe inactivados de virión fraccionados trivalentes compuestos por 3 vacunas de antígeno vírico monovalente (preparadas respectivamente a partir de las cepas de la gripe A/H1N1, A/H3N2 y B recomendadas para el hemisferio norte en 2007/2008, véase el Ejemplo X), combinadas con los sistemas de adyuvante basados en MPL y/o una emulsión de aceite en agua (o/w).

En ese ensayo se probarán dos familias del sistema de adyuvante patentado de GSK Bio:

- 30
- La familia de AS03 clasificada (1/1 - ½ - ...) por la cantidad de emulsión por dosis humana de vacuna adyuvantada;
 - La familia de AS25 de emulsión de aceite en agua complementada con MPL y clasificada (A, B, ...) por las cantidades de cada componente por dosis humana de vacuna adyuvantada.

XI.3.1. Composición de vacuna

35 La producción de las tres vacunas monovalentes de antígenos de virión inactivados fraccionados preparados a partir de semillas de trabajo de tres cepas del virus de la gripe, tipo A (H1N1 y H3N2) y tipo B, cultivadas individualmente en huevos de gallina embrionados es como ya se ha descrito (véase el Ejemplo X). Los lotes clínicos contienen 15 µg de hemaglutinina (HA) de cada cepa del virus de la gripe por dosis. Los antígenos de la gripe están adyuvantados con 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A (MPL) y/o una emulsión de aceite en agua (o/w) AS03. Van a combinarse

40 ocho formulaciones diferentes del AS con los antígenos de la gripe de virión fraccionados. El procedimiento de preparación de los adyuvantes se adapta a partir del descrito en el Ejemplo II del documento WO 2006/100111, en el que la cantidad de los componentes individuales se adaptan según la información facilitada en la Tablas 31 y 32. Los excipientes son los siguientes: Polisorbato 80 (Tween-80), octoxinol 10 (Triton® X-100), hidrogenosuccinato de α-tocoferilo, cloruro sódico, cloruro de magnesio, hidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de potasio y agua para inyección. Las diferentes formulaciones de la vacuna contra la gripe adyuvantada son

45 formulaciones libres de conservante. Sin embargo, contienen cantidades traza de tiomersal (< 1,25 µg de Hg por dosis) de las fases tempranas del procedimiento de fabricación del principio activo en las que se añade para reducir la biocarga.

5 La vacuna contra la gripe adyuvantada es una emulsión blanquecida estéril del virus de la gripe purificado fraccionado adyuvantado para inyección. Se presenta como una vacuna de 2 componentes que consiste en un vial de vidrio de tipo I que contiene el antígeno (suspensión) y una jeringuilla precargada de vidrio de tipo I (PFS) que contiene el adyuvante (emulsión). La vacuna se almacena a 2 a 8°C. En el momento de la inyección, el contenido de la jeringuilla precargada de antígeno se inyecta en el vial que contiene los antígenos de virión concentrados fraccionados inactivados trivalentes. Después de mezclar el contenido se saca en la jeringuilla y la aguja se sustituye por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata contra la gripe adyuvantada reconstituida se corresponde con 0,7 ml (Tablas 33 y 34).

Tabla 33 Formulaciones de vacuna

| Sistema de adyuvante | Volumen de emulsión o/w | Cantidad de MPL | Antígenos de la gripe NH 2007/2008 |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------|---|
| AS25A (AS25_1_1) | 250 µl | 25 µg | A/Islas Salomón/3/2006 (H1N1)IVR-145 |
| AS25B (AS25_1_2) | 125 µl | 25 µg | |
| AS25C (AS25_1_4) | 62,5 µl | 25 µg | |
| AS031/1 (AS03_1_1) | 250 µl | 0 µg | A/Wisconsin/67/2005 |
| AS031/2 (AS03_1_2) | 125 µl | 0 µg | |
| AS031/4 (AS03_1_4) | 62,5 µl | 0 µg | |
| AS25E - AS50 1/2 (AS50_1_2) | 125 µl | 50 µg | (H3N2) NYMCX-161 B |
| AS25F - AS50114 (AS50_1_4) | 62,5 µl | 50 µg | |
| | | | B/Malasia/2506/2004 |

10

Tabla 34 Composición de las vacunas contra la gripe adyuvantadas

| Componente | Cantidad por dosis (0,7 ml) | | | | | | | |
|-----------------------------------|---|--------------|--------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| PRINCIPIOS ACTIVOS | | | | | | | | |
| Viriones fraccionados inactivados | 15 µg de HA 15 µg de HA 15 µg de HA | | | | | | | |
| - H1N1 | | | | | | | | |
| - H3N2 | | | | | | | | |
| - B | | | | | | | | |
| ADYUVANTE | AS25A | AS25B | AS25C | AS03111 | AS03112 | AS03114 | AS25E | AS25F |
| - Emulsión (µl) | 250 | 125 | 62,5 | 250 | 125 | 62,5 | 125 | 62,5 |
| • Escualeno (mg) | 10,69 | 5,34 | 2,67 | 10,69 | 5,34 | 2,67 | 5,34 | 2,67 |
| • DL-α-tocoferol (mg) | 11,86 | 5,93 | 2,97 | 11,86 | 5,93 | 2,97 | 5,93 | 2,97 |
| • Polisorbato 80 (Tween-80) (mg) | 4,86 | 2,43 | 1,22 | 4,86 | 2,43 | 1,22 | 2,43 | 1,22 |
| - MPL | 25 µg | 25 µg | 25 µg | / | / | / | 50 µg | 50 µg |

(Continuación)

| EXCIPIENTES (VALORES DIANA) | |
|--|---------------|
| Polisorbato 80 (Tween-80) | 0,40 mg |
| Octoxinol 10 (Triton® X-100) | 0,05 mg |
| Hidrogenosuccinato de α -tocoferilo | 0,05 mg |
| Cloruro sódico | 3,92 mg |
| Cloruro de magnesio | 0,03 mg |
| Fosfato de disodio | 0,54 mg |
| Hidrogenofosfato de potasio | 0,16 mg |
| Cloruro de potasio | 0,10 mg |
| Agua para inyección | Hasta 0,70 ml |

XI.3.2. Preparación de vacunas

5 Las formulaciones de AS03 se preparan diluyendo el tampón fosfato (Na/K PO_4^{3-} 191,4 mM, NaCl 2,74 mM, KCl 54 mM, pH 6,8, y PO_4^{3-} 9,57 mM) con agua para inyección (agitación durante 15-45 min a TA hasta homogeneidad).
 10 Entonces se añade la cantidad apropiada de vacuna de emulsión de aceite en agua. La mezcla se agita durante 15-45 minutos a temperatura ambiente, y el pH se mide. Entonces, la mezcla se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,2 μm . Se realiza lavado con gas inerte estéril (nitrógeno) para producir espacio de cabeza inerte en los recipientes cargados durante mínimo 1 minuto. El adyuvante AS03 estéril se almacena a +2 - 8°C hasta envasarse asépticamente en 1,25 ml de jeringuillas de vidrio tipo I (Ph. Eur.) estériles. Cada jeringuilla contiene un volumen promedio de 60 μl (280 μl + 60 μl de sobrellenado).

Las formulaciones de AS25 se preparan diluyendo el tampón fosfato con agua para inyección (agitación durante 15-45 min a TA hasta homogeneidad). Entonces se añaden las cantidades apropiadas de vacuna de SB62 y vacuna de líquido de MPL. El resto del procedimiento es como se ha descrito anteriormente.

15 Una dosis de la vacuna contra la gripe adyuvantada reconstituida se corresponde con 0,7 ml. La concentración de HA final es 21,4 μg de cada vacuna monovalente por ml de vacuna final trivalente. La vacuna de antígenos (Ag) final se envasa en viales de vidrio de 3 ml, una dosis de antígenos de la gripe trivalentes se corresponde con un volumen de 0,42 ml. La vacuna final adyuvantada se envasa en vidrio PFS de 1,25 ml, una dosis se corresponde con un volumen de 0,28 ml. La dosis de vacuna final después de reconstitución será de 0,7 ml.

20 Para permitir la inyección del volumen nominal (0,7 ml) después de la reconstitución, cada vial de Ag se carga con un volumen diana de 0,51 ml y cada jeringuilla de AS se carga con un volumen diana de 0,34 ml.

XI.4. Resultados de inmunogenicidad - Respuesta inmunitaria humoral**XI.4.1 Títulos medios geométricos de HI (GMT)**

Los GMT para anticuerpos de HI con IC del 95% se muestran en la Tabla 35 y la Figura 19.

Tabla 35 - Tasas de seropositividad y GMT para título de anticuerpos de HI en los días 0 y 21 (cohorte de ATP para HI por inmunogenicidad)

| Anticuerpo | Grupo | Momento | N | >=10 1/DIL | | | | GMT | | | | |
|-----------------|----------|----------|-----|------------|------|------------|------|-------|------------|-------|-------|--------|
| | | | | n | % | IC del 95% | | valor | IC del 95% | | Mín | Máx |
| | | | | | | LI | LS | | LI | LS | | |
| A/Isias Salomón | AS03_1_4 | PRE | 191 | 97 | 50,8 | 43,5 | 58,1 | 10,6 | 9,3 | 12,2 | <10,0 | 453,0 |
| | | PI (D21) | 191 | 184 | 96,3 | 92,6 | 98,5 | 82,3 | 69,7 | 97,1 | <10,0 | 2560,0 |
| | AS03_1_2 | PRE | 191 | 91 | 47,6 | 40,4 | 55,0 | 10,8 | 9,4 | 12,4 | <10,0 | 226,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 188 | 97,9 | 94,8 | 99,4 | 102,2 | 87,0 | 119,9 | <10,0 | 1280,0 |
| | AS03_1_1 | PRE | 189 | 86 | 45,5 | 38,3 | 52,9 | 10,1 | 8,8 | 11,5 | <10,0 | 320,0 |
| | | PI (D21) | 189 | 185 | 97,9 | 94,7 | 99,4 | 98,2 | 84,3 | 114,3 | <10,0 | 3620,0 |
| | AS25_1_4 | PRE | 194 | 97 | 50,0 | 42,8 | 57,2 | 10,6 | 9,3 | 12,1 | <10,0 | 226,0 |
| | | PI (D21) | 194 | 189 | 97,4 | 94,1 | 99,2 | 91,7 | 76,9 | 109,3 | <10,0 | 1810,0 |
| | AS25_1_2 | PRE | 192 | 97 | 50,5 | 43,2 | 57,8 | 12,0 | 10,3 | 14,0 | <10,0 | 320,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 190 | 99,0 | 96,3 | 99,9 | 113,2 | 96,0 | 133,6 | <10,0 | 2560,0 |
| | AS25_1_1 | PRE | 193 | 88 | 45,6 | 38,4 | 52,9 | 9,9 | 8,6 | 11,3 | <10,0 | 320,0 |
| | | PI (D21) | 193 | 188 | 97,4 | 94,1 | 99,2 | 114,4 | 97,1 | 134,8 | <10,0 | 1810,0 |
| | AS50_1_4 | PRE | 192 | 87 | 45,3 | 38,1 | 52,6 | 10,2 | 8,9 | 11,7 | <10,0 | 160,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 183 | 95,3 | 91,3 | 97,8 | 78,5 | 65,9 | 93,5 | <10,0 | 1280,0 |
| | AS50_1_2 | PRE | 189 | 91 | 48,1 | 40,8 | 55,5 | 10,3 | 9,0 | 11,9 | <10,0 | 640,0 |
| | | PI (D21) | 189 | 183 | 96,8 | 93,2 | 98,8 | 111,8 | 93,3 | 134,0 | <10,0 | 1280,0 |
| Flu_ELD | | PRE | 187 | 88 | 47,1 | 39,7 | 54,5 | 10,7 | 9,2 | 12,4 | <10,0 | 2560,0 |
| | | PI (D21) | 188 | 177 | 94,1 | 89,8 | 97,0 | 59,6 | 49,6 | 71,7 | <10,0 | 3620,0 |

(continuación)

| | | >=10 1/DIL | | | | GMT | | | | | | |
|-------------|----------|------------|-----|------|------|------------|-------|-------|-------|------------|--------|---------|
| Anticuerpo | Grupo | Momento | N | n | % | IC del 95% | | | valor | IC del 95% | | |
| | | | | | | LI | LS | Mín | | LI | LS | Mín |
| | Flu_YNG | PRE | 197 | 122 | 61,9 | 54,8 | 68,7 | 21,3 | 17,1 | 26,5 | <10,0 | 1810,0 |
| | | PI (D21) | 197 | 195 | 99,0 | 96,4 | 99,9 | 271,6 | 224,6 | 328,4 | <10,0 | 5120,0 |
| A/Wisconsin | AS03_1_4 | PRE | 191 | 176 | 92,1 | 87,4 | 95,5 | 59,9 | 49,5 | 72,4 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 191 | 190 | 99,5 | 97,1 | 100 | 276,2 | 238,8 | 319,6 | <10,0 | 5120,0 |
| | AS03_1_2 | PRE | 191 | 168 | 88,0 | 82,5 | 92,2 | 51,2 | 41,9 | 62,4 | <10,0 | 905,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 192 | 100 | 98,1 | 100 | 350,2 | 298,0 | 411,4 | 14,0 | 14480,0 |
| | AS03_1_1 | PRE | 189 | 168 | 88,9 | 83,5 | 93,0 | 44,4 | 36,5 | 54,0 | <10,0 | 2560,0 |
| | | PI (D21) | 189 | 189 | 100 | 98,1 | 100 | 351,3 | 304,8 | 404,8 | 28,0 | 5120,0 |
| | AS25_1_4 | PRE | 194 | 175 | 90,2 | 85,1 | 94,0 | 65,7 | 53,7 | 80,4 | <10,0 | 2560,0 |
| | | PI (D21) | 194 | 194 | 100 | 98,1 | 100 | 309,2 | 264,9 | 361,0 | 10,0 | 5120,0 |
| | AS25_1_2 | PRE | 192 | 174 | 90,6 | 85,6 | 94,3 | 61,1 | 50,6 | 73,8 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 192 | 100 | 98,1 | 100 | 331,1 | 289,6 | 378,6 | 40,0 | 5120,0 |
| AS25_1_1 | PRE | 193 | 173 | 89,6 | 84,4 | 93,6 | 55,8 | 46,2 | 67,4 | <10,0 | 1280,0 | |
| | PI (D21) | 193 | 192 | 99,5 | 97,1 | 100 | 438,1 | 379,7 | 505,4 | <10,0 | 3620,0 | |
| AS50_1_4 | PRE | 192 | 168 | 87,5 | 82,0 | 91,8 | 54,6 | 44,5 | 67,0 | <10,0 | 2560,0 | |
| | PI (D21) | 192 | 191 | 99,5 | 97,1 | 100 | 263,3 | 225,3 | 307,7 | <10,0 | 5120,0 | |
| AS50_1_2 | PRE | 189 | 166 | 87,8 | 82,3 | 92,1 | 57,8 | 47,1 | 70,9 | <10,0 | 2560,0 | |

(continuación)

| | | >=10 1/DIL | | | | GMT | | | | | | |
|------------|----------|------------|-----|-----|------|------------|------|-------|------------|-------|-------|--------|
| Anticuerpo | Grupo | Momento | N | n | % | IC del 95% | | valor | IC del 95% | | Mín | Máx |
| | | | | | | LI | LS | | LI | LS | | |
| | | PI (D21) | 189 | 188 | 99,5 | 97,1 | 100 | 347,5 | 296,4 | 407,3 | <10,0 | 2560,0 |
| | Flu_ELD | PRE | 187 | 169 | 90,4 | 85,2 | 94,2 | 61,0 | 49,8 | 74,7 | <10,0 | 1810,0 |
| | | PI (D21) | 188 | 188 | 100 | 98,1 | 100 | 186,7 | 158,0 | 220,7 | 10,0 | 2560,0 |
| | Flu_YNG | PRE | 197 | 166 | 84,3 | 78,4 | 89,1 | 47,8 | 39,2 | 58,4 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 197 | 197 | 100 | 98,1 | 100 | 380,2 | 331,6 | 435,9 | 40,0 | 5120,0 |
| B/Malasia | | PRE | 191 | 178 | 93,2 | 88,6 | 96,3 | 58,6 | 49,8 | 68,9 | <10,0 | 2560,0 |
| | | PI (D21) | 191 | 190 | 99,5 | 97,1 | 100 | 147,1 | 129,1 | 167,6 | <10,0 | 2560,0 |
| | AS03_1_2 | PRE | 191 | 180 | 94,2 | 89,9 | 97,1 | 53,7 | 45,7 | 63,2 | <10,0 | 640,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 192 | 100 | 98,1 | 100 | 163,1 | 142,5 | 186,6 | 14,0 | 2560,0 |
| | AS03_1_1 | PRE | 189 | 177 | 93,7 | 89,2 | 96,7 | 57,0 | 48,2 | 67,5 | <10,0 | 2560,0 |
| | | PI (D21) | 189 | 189 | 100 | 98,1 | 100 | 172,1 | 149,9 | 197,6 | 14,0 | 2560,0 |
| | AS25_1_4 | PRE | 194 | 183 | 94,3 | 90,1 | 97,1 | 62,6 | 53,3 | 73,4 | <10,0 | 1810,0 |
| | | PI (D21) | 194 | 194 | 100 | 98,1 | 100 | 152,4 | 134,4 | 172,7 | 20,0 | 2560,0 |
| | AS25_1_2 | PRE | 192 | 184 | 95,8 | 92,0 | 98,2 | 77,8 | 66,0 | 91,7 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 192 | 192 | 100 | 98,1 | 100 | 181,4 | 158,9 | 207,1 | 10,0 | 2560,0 |
| | AS25_1_1 | PRE | 193 | 186 | 96,4 | 92,7 | 98,5 | 62,9 | 53,9 | 73,4 | <10,0 | 2560,0 |
| | | PI (D21) | 193 | 193 | 100 | 98,1 | 100 | 202,0 | 179,7 | 227,1 | 20,0 | 3620,0 |
| | AS50_1_4 | PRE | 192 | 179 | 93,2 | 88,7 | 96,3 | 58,2 | 49,0 | 69,1 | <10,0 | 1280,0 |

(continuación)

| | | >=10 1/DIL | | | | GMT | | | | | | |
|------------|----------|------------|-----|-----|------|------------|------|--------|------------|-------|-------|--------|
| Anticuerpo | Grupo | Momento | N | n | % | IC del 95% | | valor | IC del 95% | | Mín | Máx |
| | | | | | | LI | LS | | LI | LS | | |
| | | PI (D21) | 192 | 192 | 100 | 98,1 | 100 | 155,7 | 134,8 | 179,8 | 20,0 | 5120,0 |
| | AS50_1_2 | PRE | 189 | 176 | 93,1 | 88,5 | 96,3 | 62,6 | 53,0 | 74,0 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 189 | 189 | 100 | 98,1 | 100 | 174,6 | 152,0 | 200,7 | 10,0 | 2560,0 |
| | Flu_ELD | PRE | 187 | 179 | 95,7 | 91,7 | 98,1 | 66,5 | 56,5 | 78,3 | <10,0 | 905,0 |
| | | PI (D21) | 188 | 188 | 100 | 98,1 | 100 | 153,0 | 135,2 | 173,1 | 20,0 | 1280,0 |
| | Flu_YNG | PRE | 197 | 135 | 68,5 | 61,5 | 74,9 | 23,4 | 19,1 | 28,7 | <10,0 | 1280,0 |
| | | PI (D21) | 197 | 197 | 100 | 98,1 | 100 | 1281,9 | 241,7 | 328,7 | 20,0 | 5120,0 |

Flu_ELD = Fluarix para ancianos (edad >= 65 años); Flu_YNG = Fluarix para jóvenes (edad 18-40 años)

GMT = Título de anticuerpos medio geométrico calculado en todos los sujetos

N = Número de sujetos con resultados disponibles

n/% = Número/porcentaje de sujetos con título dentro del intervalo especificado

IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%; LI = Límite inferior, LS = Límite superior; Mín/Máx = Mínimo/máximo

PRE = Dosis 1 antes de la vacunación (Día 0); PI (D21) = Dosis 1 después de la vacunación (Día 21)

Conclusión intermedia

La vacuna contra la gripe adyuvantada con una dosis completa de AS03 y 25 µg de MPL (AS25_1_1) provoca una respuesta de HI estadísticamente significativamente mejor para la cepa B/Malasia en comparación con *Fluarix* en sujetos de ≥65 años de edad. Para las otras dos cepas, todas las vacunas adyuvantadas, excepto aquellas con un cuarto de una dosis de AS03, funcionaron bien en comparación con *Fluarix* en sujetos de ≥65 años de edad en este estudio.

5

XI.4.2 Factores de seroconversión de títulos de anticuerpos anti-HI, tasas de seroprotección y tasas de seroconversión (establece una correlación de la protección como se establece para la vacuna contra la gripe en seres humanos)

10 Los resultados se presentan en la Tablas 36 - Figura 20 (una por cepa) para tasas de seroprotección, Tabla 37 - Figura 21 para tasas de seroconversión y Tabla 38 - Figura 22 para factores de seroconversión.

Tabla 36 - SPR para título de anticuerpos de HI en D0 y D21 (cohorte de ATP para HI)

| | | | | SPR | | | |
|-------------------|----------|----------|-----|------------|------|------|------|
| | | | | IC del 95% | | | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| A/Islas Salomón | AS03_1_4 | PRE | 191 | 27 | 14,1 | 9,5 | 19,9 |
| | | PI (D21) | 191 | 160 | 83,8 | 77,8 | 88,7 |
| | AS03_1_2 | PRE | 191 | 31 | 16,2 | 11,3 | 22,2 |
| | | PI (D21) | 192 | 168 | 87,5 | 82,0 | 91,8 |
| | AS03_1_1 | PRE | 189 | 25 | 13,2 | 8,7 | 18,9 |
| | | PI (D21) | 189 | 171 | 90,5 | 85,4 | 94,3 |
| | AS25_1_4 | PRE | 194 | 33 | 17,0 | 12,0 | 23,1 |
| | | PI (D21) | 194 | 158 | 81,4 | 75,2 | 86,7 |
| | AS25_1_2 | PRE | 192 | 44 | 22,9 | 17,2 | 29,5 |
| | | PI (D21) | 192 | 169 | 88,0 | 82,6 | 92,3 |
| | AS25_1_1 | PRE | 193 | 23 | 11,9 | 7,7 | 17,3 |
| | | PI (D21) | 193 | 172 | 89,1 | 83,8 | 93,1 |
| | AS50_1_4 | PRE | 192 | 22 | 11,5 | 7,3 | 16,8 |
| | | PI (D21) | 192 | 153 | 79,7 | 73,3 | 85,1 |
| | AS50_1_2 | PRE | 189 | 26 | 13,8 | 9,2 | 19,5 |
| | | PI (D21) | 189 | 163 | 86,2 | 80,5 | 90,8 |
| | Flu_ELD | PRE | 187 | 31 | 16,6 | 11,6 | 22,7 |
| | | PI (D21) | 188 | 132 | 70,2 | 63,1 | 76,6 |
| | Flu_YNG | PRE | 197 | 69 | 35,0 | 28,4 | 42,1 |
| | | PI (D21) | 197 | 182 | 92,4 | 87,8 | 95,7 |

ES 2 377 761 T3

(continuación)

| | | | | SPR | | | |
|-------------------|----------|----------|-----|------|------|------------|------|
| | | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| AWisconsin | AS03_1_4 | PRE | 191 | 133 | 69,6 | 62,6 | 76,1 |
| | | PI (D21) | 191 | 188 | 98,4 | 95,5 | 99,7 |
| | AS03_1_2 | PRE | 191 | 124 | 64,9 | 57,7 | 71,7 |
| | | PI (D21) | 192 | 189 | 98,4 | 95,5 | 99,7 |
| | AS03_1_1 | PRE | 189 | 113 | 59,8 | 52,4 | 66,8 |
| | | PI (D21) | 189 | 188 | 99,5 | 97,1 | 100 |
| | AS25_1_4 | PRE | 194 | 139 | 71,6 | 64,8 | 77,9 |
| | | PI (D21) | 194 | 190 | 97,9 | 94,8 | 99,4 |
| | AS25_1_2 | PRE | 192 | 131 | 68,2 | 61,1 | 74,7 |
| | | PI (D21) | 192 | 192 | 100 | 98,1 | 100 |
| | AS25_1_1 | PRE | 193 | 139 | 72,0 | 65,1 | 78,2 |
| | | PI (D21) | 193 | 191 | 99,0 | 96,3 | 99,9 |
| | AS50_1_4 | PRE | 192 | 130 | 67,7 | 60,6 | 74,3 |
| | | PI (D21) | 192 | 187 | 97,4 | 94,0 | 99,1 |
| | AS50_1_2 | PRE | 189 | 134 | 70,9 | 63,9 | 77,3 |
| | | PI (D21) | 189 | 185 | 97,9 | 94,7 | 99,4 |
| | Flu_ELD | PRE | 187 | 132 | 70,6 | 63,5 | 77,0 |
| | | PI (D21) | 188 | 179 | 95,2 | 91,1 | 97,8 |
| Flu_YNG | PRE | 197 | 122 | 61,9 | 54,8 | 68,7 | |
| | PI (D21) | 197 | 197 | 100 | 98,1 | 100 | |

ES 2 377 761 T3

(continuación)

| | | | | SPR | | | |
|-------------------|----------|----------|-----|-----|------|------------|------|
| | | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | Momento | N | n | % | LI | LS |
| B/Malasia | AS03_1_4 | PRE | 191 | 138 | 72,3 | 65,3 | 78,5 |
| | | PI (D21) | 191 | 183 | 95,8 | 91,9 | 98,2 |
| | AS03_1_2 | PRE | 191 | 140 | 73,3 | 66,4 | 79,4 |
| | | PI (D21) | 192 | 183 | 95,3 | 91,3 | 97,8 |
| | AS03_1_1 | PRE | 189 | 138 | 73,0 | 66,1 | 79,2 |
| | | PI (D21) | 189 | 184 | 97,4 | 93,9 | 99,1 |
| | AS25_1_4 | PRE | 194 | 148 | 76,3 | 69,7 | 82,1 |
| | | PI (D21) | 194 | 187 | 96,4 | 92,7 | 98,5 |
| | AS25_1_2 | PRE | 192 | 156 | 81,3 | 75,0 | 86,5 |
| | | PI (D21) | 192 | 186 | 96,9 | 93,3 | 98,8 |
| | AS25_1_1 | PRE | 193 | 149 | 77,2 | 70,6 | 82,9 |
| | | PI (D21) | 193 | 192 | 99,5 | 97,1 | 100 |
| | AS50_1_4 | PRE | 192 | 139 | 72,4 | 65,5 | 78,6 |
| | | PI (D21) | 192 | 182 | 94,8 | 90,6 | 97,5 |
| | AS50_1_2 | PRE | 189 | 145 | 76,7 | 70,0 | 82,5 |
| | | PI (D21) | 189 | 184 | 97,4 | 93,9 | 99,1 |
| | Flu_ELD | PRE | 187 | 144 | 77,0 | 70,3 | 82,8 |
| | | PI (D21) | 188 | 183 | 97,3 | 93,9 | 99,1 |
| | Flu_YNG | PRE | 197 | 77 | 39,1 | 32,2 | 46,3 |
| | | PI (D21) | 197 | 195 | 99,0 | 96,4 | 99,9 |

Tabla 37 - SCR para título de anticuerpos de HI en el día 21 (cohorte de ATP para HI por inmunogenicidad)

| | | | SCR | | | |
|-------------------|----------|-----|-----|------|------------|------|
| | | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | N | n | % | LI | LS |
| A/Isias Salomón | AS03_1_4 | 191 | 133 | 69,6 | 62,6 | 76,1 |
| | AS03_1_2 | 191 | 138 | 72,3 | 65,3 | 78,5 |
| | AS03_1_1 | 189 | 154 | 81,5 | 75,2 | 86,7 |
| | AS25_1_4 | 194 | 130 | 67,0 | 59,9 | 73,6 |
| | AS25_1_2 | 192 | 142 | 74,0 | 67,1 | 80,0 |
| | AS25_1_1 | 193 | 151 | 78,2 | 71,7 | 83,8 |
| | AS50_1_4 | 192 | 129 | 67,2 | 60,1 | 73,8 |
| | AS50_1_2 | 189 | 146 | 77,2 | 70,6 | 83,0 |
| | Flu_ELD | 187 | 99 | 52,9 | 45,5 | 60,3 |
| | Flu_YNG | 197 | 135 | 68,5 | 61,5 | 74,9 |
| A/Wisconsin | AS03_1_4 | 191 | 108 | 56,5 | 49,2 | 63,7 |
| | AS03_1_2 | 191 | 124 | 64,9 | 57,7 | 71,7 |
| | AS03_1_1 | 189 | 141 | 74,6 | 67,8 | 80,6 |
| | AS25_1_4 | 194 | 104 | 53,6 | 46,3 | 60,8 |
| | AS25_1_2 | 192 | 124 | 64,6 | 57,4 | 71,3 |
| | AS25_1_1 | 193 | 142 | 73,6 | 66,8 | 79,6 |
| | AS50_1_4 | 192 | 110 | 57,3 | 50,0 | 64,4 |
| | AS50_1_2 | 189 | 131 | 69,3 | 62,2 | 75,8 |
| | Flu_ELD | 187 | 69 | 36,9 | 30,0 | 44,2 |
| | Flu_YNG | 197 | 130 | 66,0 | 58,9 | 72,6 |
| B/Malasia | AS03_1_4 | 191 | 47 | 24,6 | 18,7 | 31,3 |
| | AS03_1_2 | 191 | 73 | 38,2 | 31,3 | 45,5 |
| | AS03_1_1 | 189 | 65 | 34,4 | 27,6 | 41,6 |
| | AS25_1_4 | 194 | 44 | 22,7 | 17,0 | 29,2 |
| | AS25_1_2 | 192 | 45 | 23,4 | 17,6 | 30,1 |
| | AS25_1_1 | 193 | 79 | 40,9 | 33,9 | 48,2 |
| | AS50_1_4 | 192 | 50 | 26,0 | 20,0 | 32,9 |
| | AS50_1_2 | 189 | 55 | 29,1 | 22,7 | 36,1 |
| | Flu_ELD | 187 | 47 | 25,1 | 19,1 | 32,0 |
| | Flu_YNG | 197 | 147 | 74,6 | 67,9 | 80,5 |

(continuación)

Seroconversión definida como:
 Para sujetos inicialmente seronegativos, título de anticuerpos ≥ 40 1/DIL después de la vacunación
 Para sujetos inicialmente seropositivos, título de anticuerpos después de la vacunación ≥ 4 veces el título de anticuerpos antes de la vacunación
 N = Número de sujetos con resultados disponibles antes y después de la vacunación
 n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos
 IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior

Tabla 38 - SCF para título de anticuerpos de HI en el día 21 (cohorte de ATP para HI por inmunogenicidad)

| | | | SCF | | |
|-------------------|----------|-----|-------|------------|------|
| | | | | IC del 95% | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | N | Valor | LI | LS |
| A/Islands Salomón | AS03_1_4 | 191 | 7,7 | 6,5 | 9,2 |
| | AS03_1_2 | 191 | 9,4 | 7,8 | 11,3 |
| | AS03_1_1 | 189 | 9,8 | 8,3 | 11,5 |
| | AS25_1_4 | 194 | 8,6 | 7,2 | 10,4 |
| | AS25_1_2 | 192 | 9,4 | 8,0 | 11,1 |
| | AS25_1_1 | 193 | 11,6 | 9,7 | 13,9 |
| | AS50_1_4 | 192 | 7,7 | 6,5 | 9,2 |
| | AS50_1_2 | 189 | 10,8 | 9,0 | 13,0 |
| | Flu_ELD | 187 | 5,6 | 4,7 | 6,8 |
| | Flu_YNG | 197 | 12,8 | 10,0 | 16,3 |
| A/Wisconsin | AS03_1_4 | 191 | 4,6 | 3,9 | 5,4 |
| | AS03_1_2 | 191 | 6,8 | 5,6 | 8,1 |
| | AS03_1_1 | 189 | 7,9 | 6,6 | 9,5 |
| | AS25_1_4 | 194 | 4,7 | 4,0 | 5,5 |
| | AS25_1_2 | 192 | 5,4 | 4,6 | 6,3 |
| | AS25_1_1 | 193 | 7,8 | 6,5 | 9,5 |
| | AS50_1_4 | 192 | 4,8 | 4,1 | 5,7 |
| | AS50_1_2 | 189 | 6,0 | 5,1 | 7,1 |
| | Flu_ELD | 187 | 3,1 | 2,6 | 3,6 |
| | Flu_YNG | 197 | 7,9 | 6,4 | 9,8 |

(continuación)

| | | | SCF | | |
|-------------------|----------|-----|------------|-----|------|
| | | | IC del 95% | | |
| Cepa de la vacuna | Grupo | N | Valor | LI | LS |
| B/Malasia | AS03_1_4 | 191 | 2,5 | 2,2 | 2,8 |
| | AS03_1_2 | 191 | 3,0 | 2,6 | 3,5 |
| | AS03_1_1 | 189 | 3,0 | 2,6 | 3,5 |
| | AS25_1_4 | 194 | 2,4 | 2,2 | 2,8 |
| | AS25_1_2 | 192 | 2,3 | 2,1 | 2,6 |
| | AS25_1_1 | 193 | 3,2 | 2,8 | 3,7 |
| | AS50_1_4 | 192 | 2,7 | 2,3 | 3,1 |
| | AS50_1_2 | 189 | 2,8 | 2,4 | 3,2 |
| | Flu_ELD | 187 | 2,3 | 2,0 | 2,6 |
| | Flu_YNG | 197 | 12,0 | 9,7 | 15,0 |

N = Número de sujetos con resultados disponibles antes y después de la vacunación
 SCF = Factor de seroconversión o relación de media geométrica (media[log10(DESPUÉS/ANTES)])
 IC del 95% = Intervalo de confianza del 95%, LI = Límite inferior, LS = Límite superior
 Fuente de datos = Tabla IIIA del apéndice

Conclusión intermedia para la respuesta inmunitaria humoral

Es visible un claro efecto de la dosis de AS03 (emulsión de aceite en agua) en los datos de HI.

- 5 Los GMT fueron significativamente estadísticamente mayores en los grupos de vacuna contra la gripe adyuvantada en comparación con el grupo Flu_ELD para la cepa A/Islands Salomón (excepto para AS03_1_4 y A50_1_4) y la cepa A/Wisconsin. Para la cepa B/Malasia, los GMT fueron significativamente estadísticamente mayores en el grupo AS25_1_1 en comparación con el grupo Flu_ELD. Para la cepa H3N2 (A/Wisconsin), la respuesta humoral aumenta hasta el nivel observado en adultos jóvenes para todos los grupos de vacuna contra la gripe adyuvantada, excepto en los grupos en los que se usó un 1/4 de dosis de la emulsión.

Las SCR fueron significativamente estadísticamente mayores en los grupos de vacuna contra la gripe adyuvantada en comparación con el grupo Flu_ELD para la cepa A/Islands Salomón (excepto para AS25_1_4 y A50_1_4) y la cepa A/Wisconsin. Para la cepa B/Malasia, las SCR fueron significativamente estadísticamente mayores en el grupo AS25_1_1 en comparación con el grupo Flu_ELD.

15 **XI.5. Análisis de respuesta inmunitaria mediada por célula**

Las frecuencias de linfocitos T CD4 específicos de la gripe que producen al menos dos citocinas (todas dobles) en el día 0 y el día 21 se presentan en la Tabla 39 y la Figura 23 para células reestimuladas con cepas de la vacuna reunidas.

Tabla 39 – Frecuencia de linfocitos T CD4 positivos para citocinas (por millón de linfocitos T CD4) para cepas reunidas en los días 0 y 21 (cohorte de ATP para CMI por inmunogenicidad)

| Descripción de la prueba | Grupo | Momento | N | Naus | GM | DE | Mín | Q1 | Mediana | Q3 | Máx |
|--------------------------|----------|----------|----|------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|----------|
| CD4-TODOS DOBLES | AS03_1_4 | PRE | 42 | 1 | 1013,57 | 679,94 | 1,00 | 819,00 | 1202,00 | 1790,00 | 2841,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 2038,17 | 1508,79 | 422,00 | 1479,00 | 2156,00 | 3215,00 | 6834,00 |
| | AS03_1_2 | PRE | 38 | 1 | 1085,68 | 912,10 | 1,00 | 939,00 | 1382,50 | 1921,00 | 3502,00 |
| | | PI (D21) | 39 | 0 | 2780,75 | 1529,68 | 426,00 | 2023,00 | 2851,00 | 4126,00 | 8108,00 |
| | AS03_1_1 | PRE | 48 | 1 | 870,96 | 1342,41 | 1,00 | 685,00 | 1035,50 | 1534,50 | 6956,00 |
| | | PI (D21) | 49 | 0 | 2563,84 | 1840,16 | 280,00 | 1907,00 | 2826,00 | 3636,00 | 8830,00 |
| | AS25_1_4 | PRE | 47 | 0 | 1089,72 | 853,67 | 139,00 | 664,00 | 1177,00 | 1933,00 | 3321,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 2186,84 | 1776,15 | 506,00 | 1447,00 | 2155,00 | 3234,00 | 9385,00 |
| | AS25_1_2 | PRE | 41 | 2 | 1124,53 | 1071,90 | 384,00 | 674,00 | 1194,00 | 1717,00 | 4917,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 2153,42 | 1871,41 | 348,00 | 1383,00 | 1978,00 | 3751,00 | 8426,00 |
| | AS25_1_1 | PRE | 44 | 0 | 1106,74 | 3071,01 | 140,00 | 669,00 | 1140,50 | 1731,00 | 20615,00 |
| | | PI (D21) | 44 | 0 | 2771,86 | 2784,80 | 526,00 | 1742,00 | 2773,50 | 4855,00 | 15247,00 |
| | AS50_1_4 | PRE | 41 | 2 | 867,17 | 666,69 | 77,00 | 559,00 | 835,00 | 1364,00 | 2671,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 2067,82 | 1008,33 | 303,00 | 1560,00 | 2142,00 | 2949,00 | 5044,00 |
| | AS50_1_2 | PRE | 41 | 6 | 1067,79 | 1038,58 | 169,00 | 794,00 | 1192,00 | 1512,00 | 6122,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 2421,78 | 6581,38 | 202,00 | 1447,00 | 2389,00 | 4010,00 | 46387,00 |
| | Flu_ELD | PRE | 42 | 3 | 960,35 | 998,67 | 189,00 | 561,00 | 863,50 | 1706,00 | 4356,00 |
| | | PI (D21) | 45 | 0 | 1509,05 | 2074,14 | 211,00 | 897,00 | 1452,00 | 2818,00 | 11117,00 |
| | Flu_YNG | PRE | 40 | 6 | 1681,05 | 1196,39 | 225,00 | 1144,00 | 1907,50 | 2611,00 | 5110,00 |
| | | PI (D21) | 46 | 0 | 2687,64 | 2151,90 | 830,00 | 1900,00 | 2459,50 | 4241,00 | 11758,00 |

(continuación)

| Descripción de la prueba | Grupo | Momento | N | Naus | GM | DE | Mín | Q1 | Mediana | Q3 | Máx |
|--------------------------|----------|----------|----|------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|----------|
| CD4-CD40L | AS03_1_4 | PRE | 42 | 1 | 967,13 | 664,97 | 1,00 | 842,00 | 1186,50 | 1742,00 | 2748,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1916,56 | 1502,81 | 168,00 | 1353,00 | 2102,00 | 3122,00 | 6538,00 |
| | AS03_1_2 | PRE | 38 | 1 | 1060,88 | 878,50 | 1,00 | 891,00 | 1384,00 | 1921,00 | 3398,00 |
| | | PI (D21) | 39 | 0 | 2714,74 | 1519,80 | 486,00 | 1957,00 | 2829,00 | 4076,00 | 8038,00 |
| | AS03_1_1 | PRE | 48 | 1 | 762,13 | 1329,02 | 1,00 | 645,00 | 1022,50 | 1541,00 | 6797,00 |
| | | PI (D21) | 49 | 0 | 2428,54 | 1856,48 | 210,00 | 1862,00 | 2733,00 | 3589,00 | 8809,00 |
| | AS25_1_4 | PRE | 47 | 0 | 994,17 | 865,71 | 35,00 | 579,00 | 1076,00 | 1912,00 | 3340,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 1982,33 | 1801,26 | 73,00 | 1293,00 | 2055,00 | 3159,00 | 9312,00 |
| | AS25_1_2 | PRE | 41 | 2 | 1039,63 | 1062,10 | 116,00 | 596,00 | 1152,00 | 1715,00 | 4899,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1998,69 | 1842,77 | 309,00 | 1396,00 | 1946,00 | 3459,00 | 8149,00 |
| | AS25_1_1 | PRE | 44 | 0 | 1048,77 | 1485,48 | 145,00 | 674,00 | 1108,50 | 1632,50 | 8844,00 |
| | | PI (D21) | 44 | 0 | 2529,59 | 2189,87 | 102,00 | 1599,50 | 2763,00 | 4419,50 | 9999,00 |
| | AS50_1_4 | PRE | 41 | 2 | 847,56 | 663,49 | 95,00 | 549,00 | 842,00 | 1350,00 | 2588,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1673,39 | 1043,51 | 1,00 | 1413,00 | 2062,00 | 2880,00 | 4884,00 |
| | AS50_1_2 | PRE | 41 | 6 | 1037,41 | 982,61 | 171,00 | 799,00 | 1168,00 | 1492,00 | 5650,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 2268,52 | 6584,73 | 117,00 | 1447,00 | 2245,00 | 3739,00 | 46410,00 |
| | Flu_ELD | PRE | 42 | 3 | 923,98 | 976,85 | 110,00 | 607,00 | 816,50 | 1597,00 | 4296,00 |
| | | PI (D21) | 45 | 0 | 1299,05 | 2034,85 | 1,00 | 896,00 | 1545,00 | 2818,00 | 10836,00 |
| | Flu_YNG | PRE | 40 | 6 | 1636,72 | 1186,79 | 233,00 | 1068,00 | 1878,50 | 2418,00 | 5088,00 |
| | | PI (D21) | 46 | 0 | 2575,50 | 2169,43 | 456,00 | 1862,00 | 2331,50 | 4178,00 | 11718,00 |

(continuación)

| Descripción de la prueba | Grupo | Momento | N | Naus | GM | DE | Mín | Q1 | Mediana | Q3 | Máx |
|--------------------------|----------|----------|----|------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|----------|
| CD4-IFN γ | AS03_1_4 | PRE | 42 | 1 | 721,19 | 483,64 | 114,00 | 475,00 | 772,00 | 1142,00 | 2052,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1394,52 | 1096,51 | 347,00 | 898,00 | 1305,00 | 2261,00 | 5075,00 |
| | AS03_1_2 | PRE | 38 | 1 | 712,34 | 598,18 | 1,00 | 566,00 | 936,50 | 1412,00 | 2422,00 |
| | | PI (D21) | 39 | 0 | 1894,63 | 1156,37 | 581,00 | 1297,00 | 2083,00 | 3016,00 | 6342,00 |
| | AS03_1_1 | PRE | 48 | 1 | 527,46 | 1053,96 | 1,00 | 395,00 | 544,00 | 985,50 | 6583,00 |
| | | PI (D21) | 49 | 0 | 1623,21 | 1383,09 | 104,00 | 1208,00 | 1652,00 | 2380,00 | 6983,00 |
| | AS25_1_4 | PRE | 47 | 0 | 741,88 | 643,41 | 36,00 | 430,00 | 770,00 | 1401,00 | 2602,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 1433,90 | 1206,49 | 246,00 | 861,00 | 1374,00 | 2301,00 | 5754,00 |
| | AS25_1_2 | PRE | 41 | 2 | 670,69 | 656,68 | 218,00 | 380,00 | 596,00 | 1151,00 | 3664,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1279,87 | 1279,29 | 173,00 | 617,00 | 1330,00 | 2402,00 | 5385,00 |
| | AS25_1_1 | PRE | 44 | 0 | 597,78 | 2794,11 | 1,00 | 372,50 | 652,50 | 1226,00 | 18946,00 |
| | | PI (D21) | 44 | 0 | 1802,95 | 2189,25 | 258,00 | 1133,50 | 1970,00 | 3238,00 | 13164,00 |
| | AS50_1_4 | PRE | 41 | 2 | 571,79 | 448,58 | 134,00 | 335,00 | 597,00 | 945,00 | 1901,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1325,52 | 769,76 | 188,00 | 936,00 | 1428,00 | 1959,00 | 3841,00 |
| | AS50-1-2 | PRE | 41 | 6 | 601,27 | 513,44 | 32,00 | 485,00 | 743,00 | 1025,00 | 2283,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 1550,79 | 6051,21 | 41,00 | 1016,00 | 1624,00 | 2710,00 | 42697,00 |
| | Flu_ELD | PRE | 42 | 3 | 584,91 | 588,62 | 77,00 | 396,00 | 598,00 | 955,00 | 2680,00 |
| | | PI (D21) | 45 | 0 | 980,97 | 1396,79 | 137,00 | 614,00 | 876,00 | 1662,00 | 6633,00 |
| | Flu_YNG | PRE | 40 | 6 | 1156,67 | 945,24 | 126,00 | 731,50 | 1248,00 | 2152,50 | 3774,00 |
| | | PI (D21) | 46 | 0 | 1811,65 | 1618,60 | 411,00 | 1162,00 | 1813,00 | 2524,00 | 8432,00 |

(continuación)

| Descripción de la prueba | Grupo | Momento | N | Naus | GM | DE | Mín | Q1 | Mediana | Q3 | Máx |
|--------------------------|----------|----------|----|------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|----------|
| CD4-IL2 | AS03-1-4 | PRE | 42 | 1 | 805,41 | 572,67 | 1,00 | 683,00 | 971,50 | 1429,00 | 2562,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1563,40 | 1203,93 | 296,00 | 1116,00 | 1509,00 | 2516,00 | 5786,00 |
| | AS03_1_2 | PRE | 38 | 1 | 881,32 | 713,88 | 1,00 | 727,00 | 1191,50 | 1605,00 | 2791,00 |
| | | PI (D21) | 39 | 0 | 2057,58 | 1251,53 | 205,00 | 1522,00 | 2184,00 | 3140,00 | 7019,00 |
| | AS03_1_1 | PRE | 48 | 1 | 640,10 | 1098,72 | 1,00 | 513,50 | 813,50 | 1240,50 | 6391,00 |
| | | PI (D21) | 49 | 0 | 1955,75 | 1528,09 | 232,00 | 1407,00 | 2088,00 | 2874,00 | 7173,00 |
| | AS25_1_4 | PRE | 47 | 0 | 864,60 | 696,78 | 117,00 | 557,00 | 896,00 | 1612,00 | 2771,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 1629,80 | 1344,02 | 330,00 | 1080,00 | 1595,00 | 2504,00 | 6819,00 |
| | AS25_1_2 | PRE | 41 | 2 | 887,73 | 863,40 | 275,00 | 554,00 | 924,00 | 1431,00 | 4256,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1656,36 | 1486,45 | 316,00 | 1128,00 | 1617,00 | 2760,00 | 6311,00 |
| | AS25_1_1 | PRE | 44 | 0 | 834,27 | 755,62 | 131,00 | 537,00 | 877,00 | 1457,50 | 4105,00 |
| | | PI (D21) | 44 | 0 | 2028,18 | 1595,73 | 325,00 | 1334,00 | 2044,50 | 3624,00 | 7175,00 |
| | AS50_1_4 | PRE | 41 | 2 | 690,38 | 574,37 | 35,00 | 466,00 | 730,00 | 1132,00 | 2423,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1533,43 | 780,68 | 194,00 | 1145,00 | 1477,00 | 2269,00 | 3752,00 |
| | AS50_1_2 | PRE | 41 | 6 | 831,91 | 720,68 | 102,00 | 620,00 | 879,00 | 1221,00 | 3918,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 1862,37 | 5848,13 | 158,00 | 1154,00 | 1852,00 | 3278,00 | 41253,00 |
| | Flu_ELD | PRE | 42 | 3 | 729,05 | 856,17 | 177,00 | 369,00 | 716,00 | 1299,00 | 3514,00 |
| | | PI (D21) | 45 | 0 | 1191,28 | 1688,15 | 145,00 | 620,00 | 1301,00 | 2414,00 | 9166,00 |
| | Flu_YNG | PRE | 40 | 6 | 1210,88 | 920,74 | 138,00 | 747,00 | 1308,50 | 1909,50 | 3925,00 |
| | | PI (D21) | 46 | 0 | 2033,00 | 1700,20 | 684,00 | 1429,00 | 1940,50 | 3296,00 | 9375,00 |

(continuación)

| Descripción de la prueba | Grupo | Momento | N | Naus | GM | DE | Mín | Q1 | Mediana | Q3 | Máx |
|--------------------------|----------|----------|----|------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|----------|
| CD4-TNF α | AS03_1_4 | PRE | 42 | 1 | 652,51 | 499,99 | 1,00 | 538,00 | 778,00 | 1141,00 | 2037,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1147,97 | 942,25 | 126,00 | 677,00 | 1251,00 | 2054,00 | 4142,00 |
| AS03_1_2 | AS03_1_2 | PRE | 38 | 1 | 755,02 | 646,69 | 1,00 | 607,00 | 985,00 | 1429,00 | 2844,00 |
| | | PI (D21) | 39 | 0 | 1596,30 | 975,22 | 295,00 | 1113,00 | 1695,00 | 2577,00 | 4927,00 |
| AS03_1_1 | AS03_1_1 | PRE | 48 | 1 | 550,23 | 1016,73 | 1,00 | 343,50 | 605,50 | 1001,00 | 5709,00 |
| | | PI (D21) | 49 | 0 | 1445,35 | 1172,61 | 132,00 | 989,00 | 1578,00 | 2128,00 | 5107,00 |
| AS25_1_4 | AS25_1_4 | PRE | 47 | 0 | 673,18 | 622,76 | 91,00 | 352,00 | 673,00 | 1460,00 | 2299,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 1172,10 | 1122,07 | 193,00 | 722,00 | 1122,00 | 1987,00 | 6086,00 |
| AS25_1_2 | AS25_1_2 | PRE | 41 | 2 | 708,33 | 761,85 | 191,00 | 447,00 | 730,00 | 1004,00 | 3592,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1228,68 | 1330,12 | 171,00 | 671,00 | 1224,00 | 2452,00 | 6334,00 |
| AS25_1_1 | AS25_1_1 | PRE | 44 | 0 | 693,62 | 2910,36 | 116,00 | 358,00 | 615,00 | 1077,00 | 19515,00 |
| | | PI (D21) | 44 | 0 | 1435,67 | 2242,66 | 13,00 | 908,50 | 1490,00 | 3017,00 | 13332,00 |
| AS50_1_4 | AS50_1_4 | PRE | 41 | 2 | 538,80 | 433,49 | 37,00 | 331,00 | 655,00 | 935,00 | 1648,00 |
| | | PI (D21) | 43 | 0 | 1204,59 | 698,67 | 364,00 | 814,00 | 1295,00 | 1934,00 | 3219,00 |
| AS50_1_2 | AS50_1_2 | PRE | 41 | 6 | 658,48 | 764,82 | 75,00 | 440,00 | 810,00 | 1078,00 | 4501,00 |
| | | PI (D21) | 47 | 0 | 1349,54 | 4822,50 | 39,00 | 895,00 | 1297,00 | 2514,00 | 33798,00 |
| Flu_ELD | Flu_ELD | PRE | 42 | 3 | 558,80 | 704,36 | 40,00 | 326,00 | 627,00 | 1189,00 | 2767,00 |
| | | PI (D21) | 45 | 0 | 819,29 | 1407,45 | 1,00 | 543,00 | 969,00 | 1694,00 | 7960,00 |
| Flu_YNG | Flu_YNG | PRE | 40 | 6 | 1056,84 | 852,19 | 221,00 | 633,00 | 1129,50 | 1724,50 | 3947,00 |
| | | PI (D21) | 46 | 0 | 1426,37 | 1615,23 | 385,00 | 852,00 | 1505,00 | 2355,00 | 9378,00 |

N = Número de sujetos con resultados disponibles
 Naus = Número de sujetos con resultados ausentes
 GM= Media geométrica
 DE = Desviación estándar
 Q1, Q3 = Primer y tercer cuartiles
 Mín/Máx = Mínimo/Máximo

Conclusión intermedia para la respuesta inmunitaria mediada por célula

5 Cinco vacunas adyuvantadas (AS03_1_1, AS03_1_2, AS25_1_1, AS50_1_2 y AS50_1_4) indujeron una respuesta CMI significativamente mayor a cepas reunidas en comparación con *Fluarix* en sujetos de ≥ 65 años de edad para todas las combinaciones de citocinas en términos de diferencias individuales (D21 - D0). Tres de estas vacunas adyuvantadas (AS03_1_1, AS03_1_2 y AS25_1_1) también indujeron una respuesta CMI significativamente mayor a cepas reunidas en comparación con *Fluarix* en adultos más jóvenes para todas las combinaciones de citocinas en términos de diferencias individuales (Día 21 - Día 0).

XI.6. Reactogenicidad*Síntomas locales*

10 El porcentaje de sujetos que informan síntomas locales esperados (cualquier grado / grado 3) durante el periodo de 7 días después de la vacunación se ha evaluado usando la clasificación de EMEA y FDA para síntomas cuantificables.

15 Clasificación de EMEA: equimosis (cualquier grado [>0 mm] y grado 3 [>50 mm]); dolor (cualquier grado); dolor de grado 3; rojez (cualquier grado [>0 mm] y grado 3 [>50 mm]) e hinchazón (cualquier grado [>0 mm]); hinchazón de grado 3 (>50 mm). Clasificación de FDA: equimosis (cualquier grado [≥ 25 mm] y grado 3 [>100 mm]), rojez de grado 3 (>100 mm); hinchazón de grado 3 (>100 mm), rojez (cualquier grado [≥ 25 mm]); hinchazón (cualquier grado [≥ 25 mm]).

Síntomas generales

20 Clasificación EMEA: fiebre ($\geq 37,58^\circ\text{C}$), fiebre de grado 3 ($>39,0^\circ\text{C}$). Clasificación de FDA: fiebre ($\geq 38^\circ\text{C}$) y fiebre de grado 3 ($>40^\circ\text{C}$).

La incidencia global y la naturaleza de cualquier síntoma esperado e inesperado y de grado 3 informado durante el periodo de 7 días (Días 0-6) después de la vacunación se presenta en la Figura 24.

Conclusión

25 El porcentaje de sujetos que informan al menos un síntoma general fue significativamente estadísticamente mayor en los grupos de vacuna contra la gripe adyuvantada en comparación con el grupo Flu_ELD, pero en el mismo intervalo que para el grupo Flu_YNG (excepto para A03_1_4).

El porcentaje de sujetos que informan al menos un síntoma general de grado 3 están en el mismo intervalo para todos los grupos.

30 El porcentaje de sujetos que informan al menos un síntoma local fue significativamente estadísticamente mayor en los grupos de vacuna contra la gripe adyuvantada en comparación con el grupo Flu_ELD y en el grupo AS25_1_1 en comparación con el grupo Flu_YNG.

El porcentaje de sujetos que informan al menos un síntoma local de grado 3 fue significativamente estadísticamente mayor en los grupos AS03_1_1, AS25_1_2, AS25_1_1 y AS50_1_2 en comparación con los grupos Flu_ELD y Flu_YNG grupos.

35 XI.7. Conclusión general

Estos datos son importantes para equilibrar apropiadamente la respuesta inmunitaria/efecto adverso en una población humana.

40 En términos de inmunogenicidad de HI se demostró un claro efecto del adyuvante, con en particular un aumento significativo para H1N1 y H3N2 con todas las dosificaciones de adyuvante. Se obtuvo un aumento significativo para la cepa B principalmente con AS25 1/1, pero también con AS03 1/1, AS03 1/2 y AS50 1/2. Se mostró un efecto a la dosis con el componente de emulsión de aceite en agua del adyuvante, y también para el componente de MPL del adyuvante, aunque éste último estuvo menos claramente marcado.

45 En términos de respuesta inmunitaria mediada por célula, también se demostró un efecto del adyuvante con una diferencia significativa en comparación con Fluarix en los ancianos para cepas reunidas (frecuencia, todas las medidas) para AS03 1/1, AS03 1/2, AS25 1/1 y AS50 1/2. Las mayores respuestas se obtuvieron con AS25 1/1, AS03 1/1 y AS03 1/2.

50 En términos de reactogenicidad, las vacunas adyuvantadas son más reactogénicas que Fluarix, asociado al componente de emulsión de aceite en agua de la vacuna; también está presente un efecto de la dosis de MPL aunque menos pronunciado. AS03 1/2 es menos reactogénica que AS03 1/1, aunque presente un perfil de inmunogenicidad satisfactorio en esta población anciana.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GlaxoSmithKline Biologicals sa
- <120> Vaccine
- <130> VB62342
- 5 <160> 6
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG sin metilar
- <400> 1
- tccatgacgt tctgacgtt 20
- 15 <210> 2
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG sin metilar
- <400> 2
- tctcccagcg tgcgcat 18
- <210> 3
- <211> 30
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG sin metilar
- <400> 3
- 30 accgatgacg tcgcccgtga cggcaccag 30
- <210> 4
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG sin metilar
- <400> 4

tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
<210> 5
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG sin metilar
<400> 5
tccatgacgt tcctgatgct 20
10 <210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG sin metilar
<400> 6
tcgacgtttt cggcgcgcgcg cg 22

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica contra la gripe en un volumen de dosis adecuado para uso humano que comprende un antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: (i) un adyuvante que consiste en 5-6 mg de escualeno, 2-3 mg de agente emulsionante, 5-7 mg de tocol por dosis humana; (ii) un adyuvante que consiste en 2-3 mg de escualeno, 1-1,5 mg de agente emulsionante, y 2,5-3,5 mg de tocol por dosis humana; (iii) un adyuvante que consiste en 0,5-1,5 mg de escualeno, 0,25-0,75 mg de agente emulsionante y 0,5-1,5 mg de tocol por dosis humana.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho agente emulsionante es un tensioactivo no iónico.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que dicho agente emulsionante es un monooleato de polioxietilensorbitano o un trioleato de sorbitano o una mezcla de ambos.
4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho tocol es alfa-tocoferol.
5. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-4, en la que el adyuvante comprende además un ligando TLR seleccionado de: un agonista de TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9 o combinación de los mismos.
6. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-5, en la que dicho antígeno del virus o preparación antigénica es 15 µg o inferior a 15 µg de HA por dosis humana por cepa de la gripe.
7. La composición inmunogénica de la reivindicación 6, en la que dicho antígeno del virus o preparación antigénica es inferior a 10 µg, o inferior a 8 µg, o inferior a 4 µg, o inferior a 2 µg de HA, o inferior a 1 µg de HA, o inferior a 0,5, o inferior a 0,1 µg de HA por dosis humana por cepa de la gripe.
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 6 ó 7, en la que dicho antígeno del virus o preparación antigénica está entre 2 - 7,5 µg, o de 1 - 5 µg de HA por dosis humana por cepa de la gripe.
9. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-8, en la que dicho antígeno del virus o preparación antigénica está entre inferior a o exactamente 5 µg de HA, o inferior a o exactamente 2,5 µg, o inferior a o exactamente 1 µg por dosis humana por cepa de la gripe.
10. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha composición es una composición monovalente que comprende un antígeno del virus o preparación antigénica de al menos una cepa de la gripe que está asociada a un brote pandémico o que tiene el potencial a asociarse a un brote de pandemia.
11. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha composición es una composición multivalente que comprende un antígeno del virus o preparación antigénica de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco cepas de la gripe.
12. La composición inmunogénica de la reivindicación 11, en la que dicha composición comprende un antígeno del virus o preparación antigénica de al menos tres de las cepas estacionales de la gripe (interpandémicas) y opcionalmente comprende un antígeno del virus o preparación antigénica de al menos una cepa de la gripe que está asociada a un brote pandémico o que tiene el potencial a asociarse a un brote de pandemia.
13. La composición inmunogénica de la reivindicación 11 ó 12, en la que dicha composición multivalente comprende un antígeno del virus o preparación antigénica seleccionada del grupo que consiste en: (i) dos cepas A interpandémicas elegidas del grupo de: H1N1 y H3N2 y dos cepas B elegidas del grupo de: B/Yamagata y B/Victoria; (ii) tres cepas A interpandémicas elegidas del grupo de: H1N1 y H3N2 y una cepa B elegida del grupo de: B/Yamagata y B/Victoria; (iii) dos cepas A interpandémicas elegidas del grupo de: H1N1 y H3N2, una cepa A pandémica, en la que la cepa es H5N1, y una cepa B elegida del grupo de B/Yamagata y B/Victoria.
14. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 10, 12-13, en la que dicha cepa del virus de la gripe pandémica se selecciona del grupo que consiste en: H5N1, H9N2, H5N8, H5N9, H7N4, H7N7, H2N2, H10N7, H5N2, H7N2, H7N1 y H7N3.
15. La composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente en la que dicho antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo es del virus de la gripe cultivado en huevos o en cultivo celular.
16. La composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente, en la que dicho antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo comprende un virus completo, un virus fraccionado, un virosoma o uno o más antígenos purificados elegidos de: HA, NA, M1, M2.
17. La composición inmunogénica según la reivindicación 16 en la que dicho(s) antígeno(s) purificado(s) se

prepara(n) a partir del virus de la gripe cultivado en células de mamífero, aviares o de insecto.

18. La composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente, en la que dicha dosis humana se selecciona de: 0,5 ml o menos, entre 0,5 y 1,5 ml, entre 0,2 y 1,2 ml, entre 0,2 y 0,7 ml y menos que o exactamente 0,25, o 0,5, o 0,7, o 1 ml.

5 19. Un procedimiento para la preparación de una vacuna contra la gripe adyuvantada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 que comprende una etapa de mezclar un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo.

20. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que el segundo volumen es mayor que el primer volumen.

10 21. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que el primer y segundo volúmenes son volúmenes sustancialmente iguales.

22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 que comprende una etapa de diluir la emulsión de aceite en agua antes de mezclar la emulsión diluida resultante con dicha suspensión acuosa de la gripe.

15 23. Un kit de vacuna que comprende un componente de antígeno del virus de la gripe o un componente de preparación antigénica del virus de la gripe como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17 y que comprende además para administración concomitante o secuencial un adyuvante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

24. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-18 para su uso en medicina.

20 25. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-18 para su uso en la prevención de enfermedad producida por infección de la gripe.

FIG. 1 - Títulos medios geométricos (GMT) para anticuerpo anti-HA en diferentes momentos de tiempo (cohorte de ATP para inmunogenicidad).

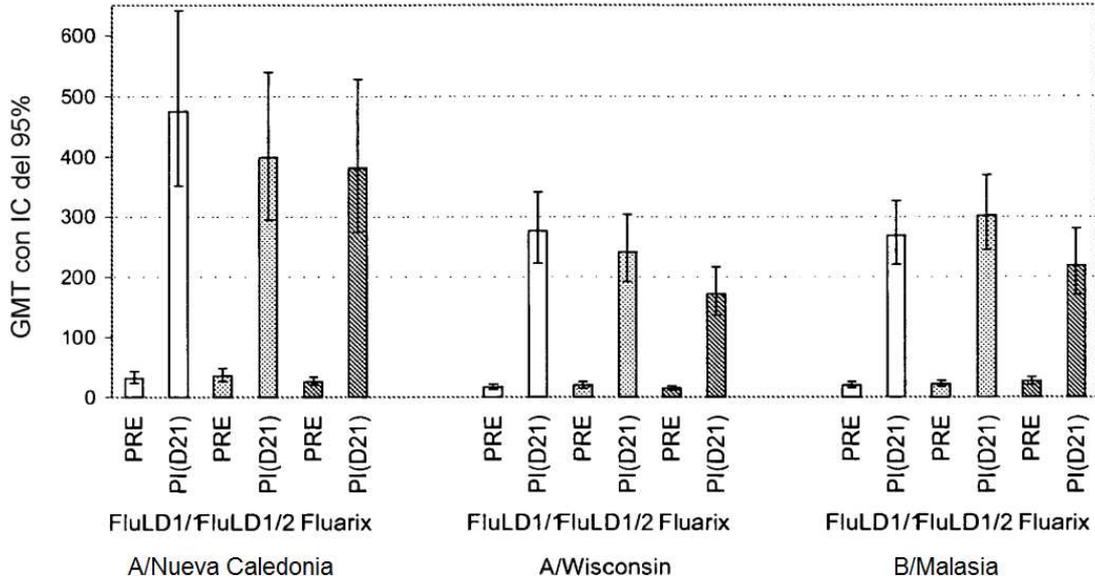


FIG. 2 - SPR para título de anticuerpos de HI con intervalo de confianza del 95% en el día 0 y día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

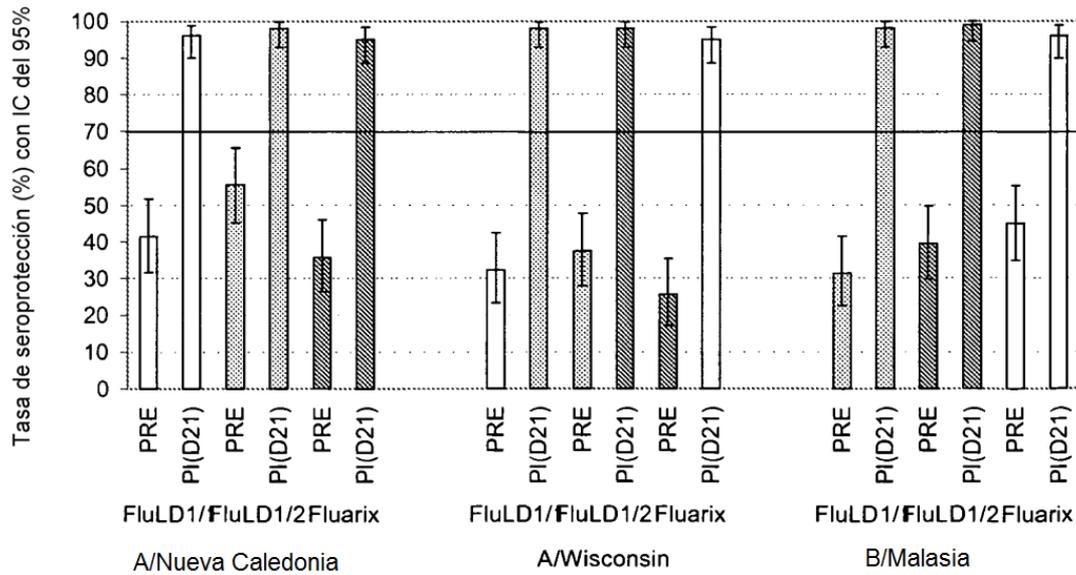


FIG. 3 - SCR para título de anticuerpos de HI con intervalo de confianza del 95% en el día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

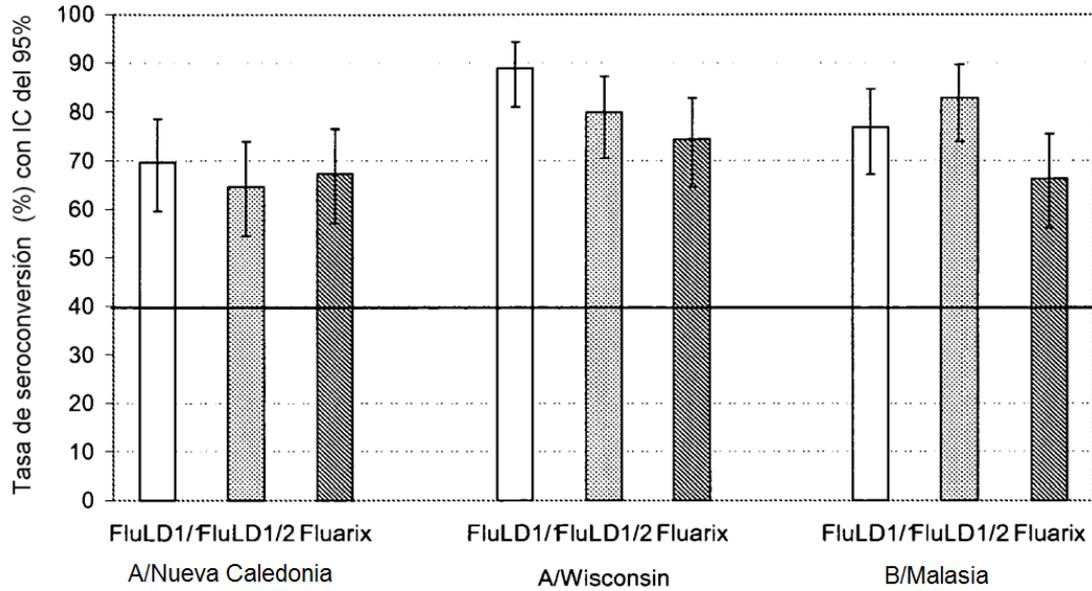


FIG. 4 - SCF para título de anticuerpos de HI con intervalo de confianza del 95% en el día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

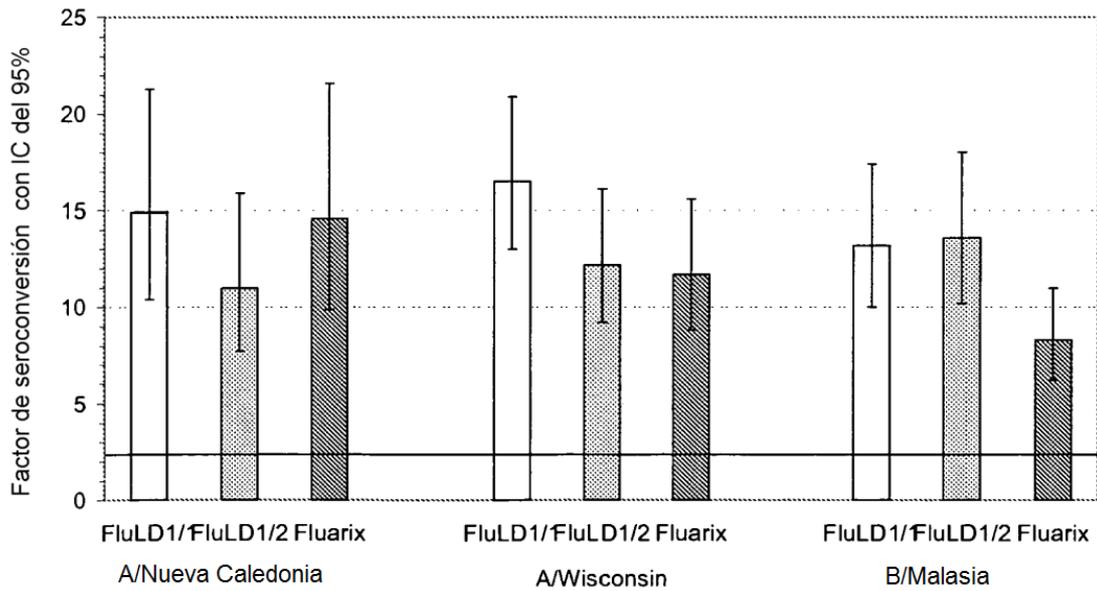


FIG. 5 Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c sensibilizados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis de AS03).

Fig. 5A - Títulos de HI para anti-A/Nueva Caledonia/20/99

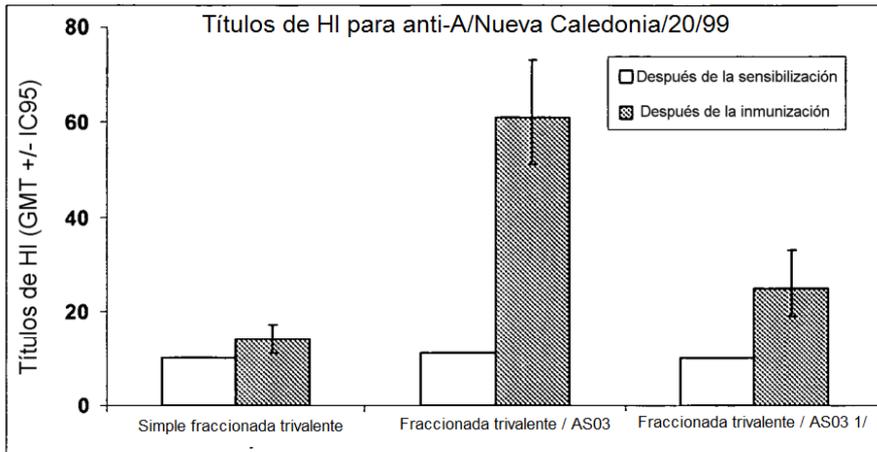


Fig. 5B - Títulos de HI para anti-A/Panamá/2007/99

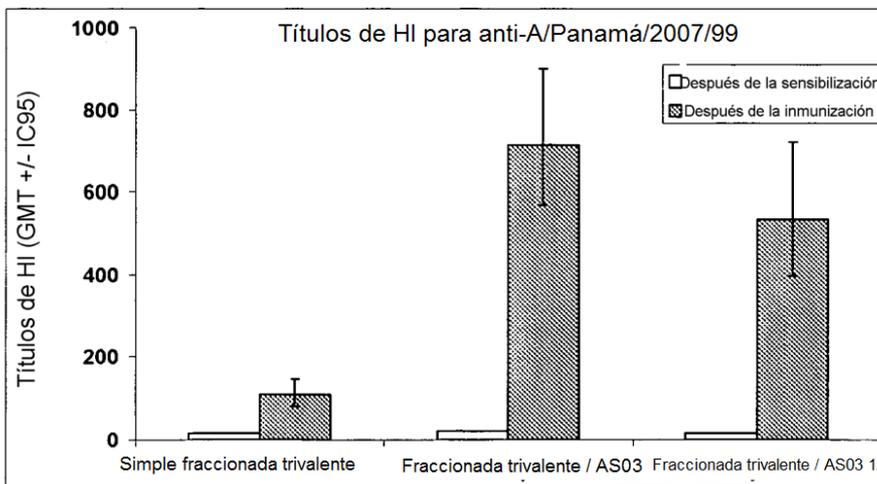


Figura 5C - Títulos de HI para anti-B/Shandong/7/97

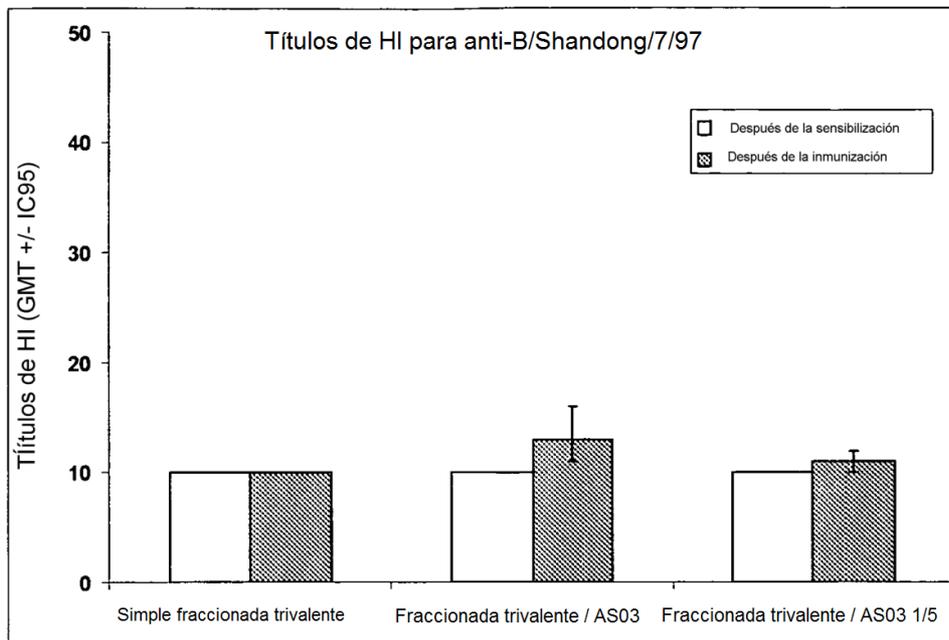


FIG. 6 Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 sensibilizados con cepas heterosubtipicas (intervalo de dosis de AS03)

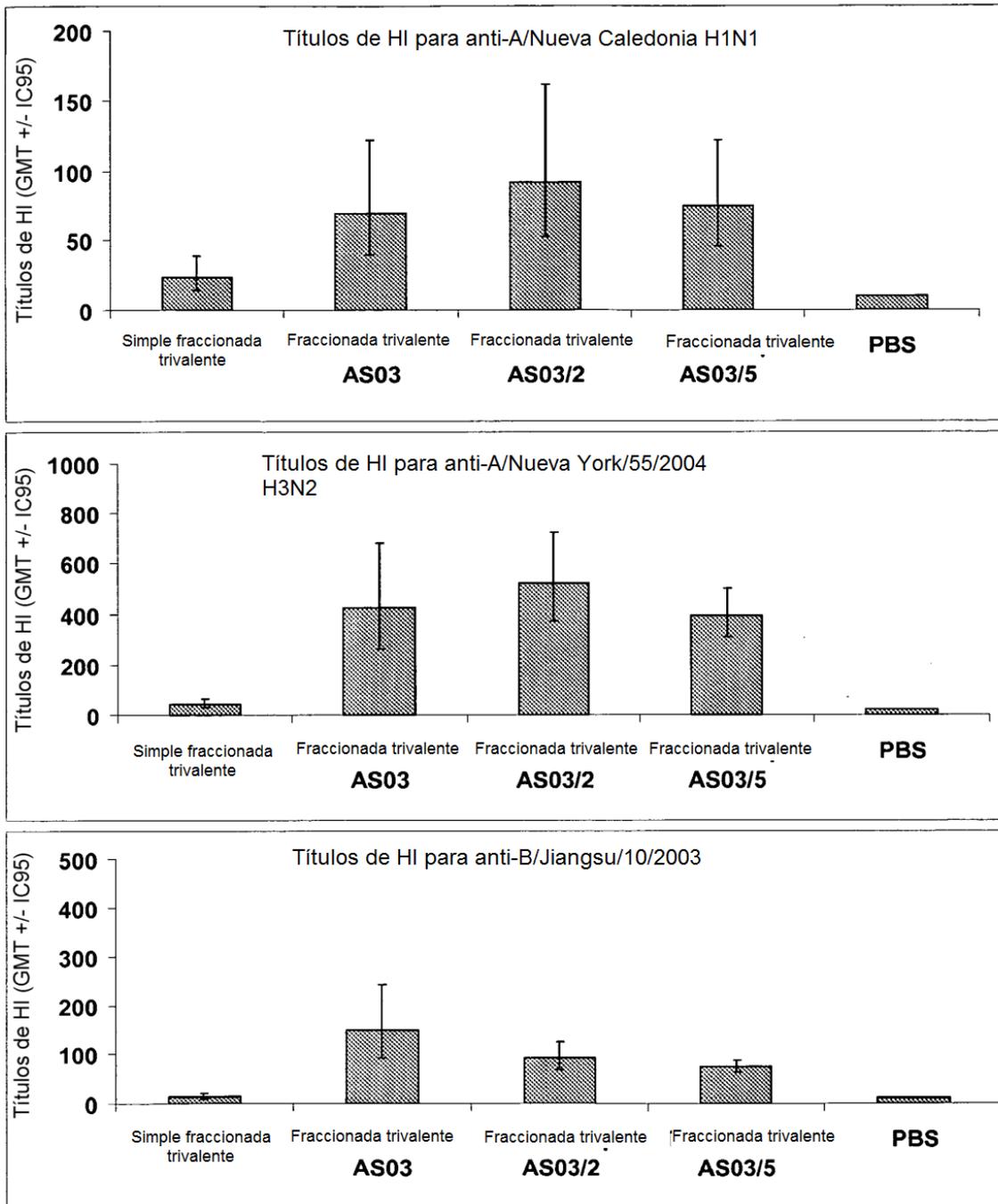


FIG. 7 Respuesta inmunitaria celular (linfocito T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 sensibilizados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis de AS03)

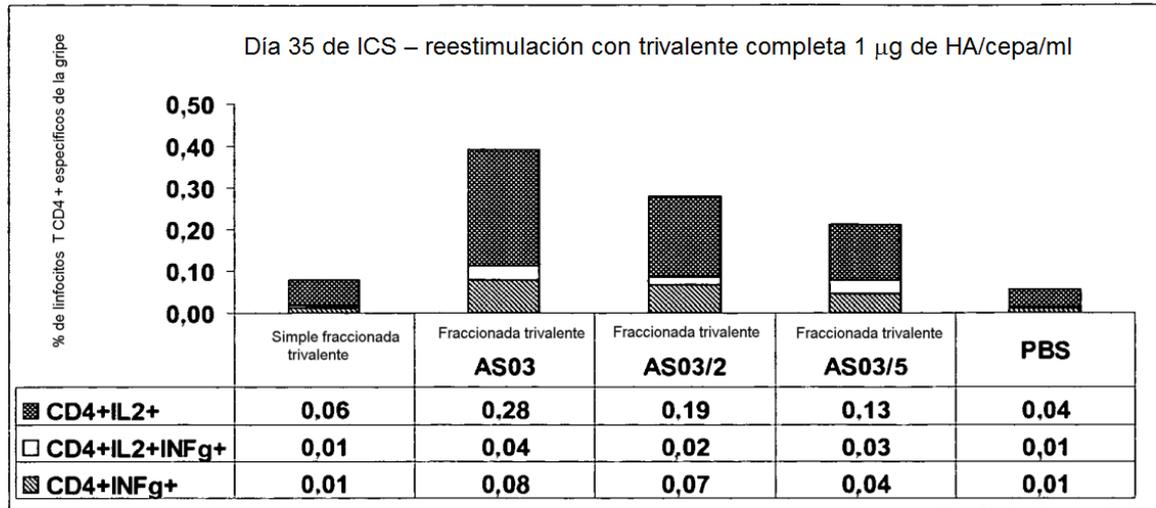


FIG. 8 Respuesta inmunitaria celular (linfocito T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 sensibilizados con cepas heterosubtípicas e inmunizados con antígeno de dosis baja (0,5 µg) adyuvantado con intervalo de dosis de AS03

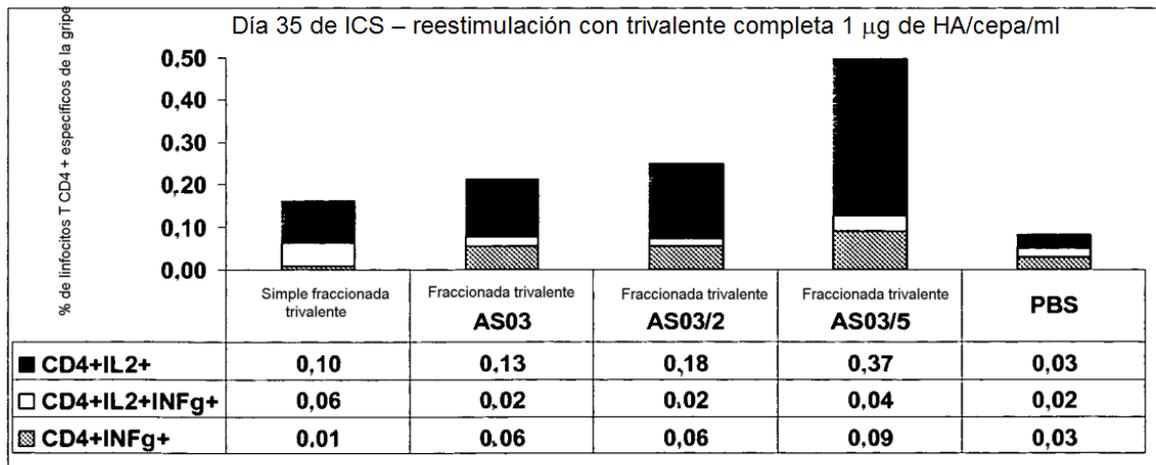


Fig. 9 Títulos por ELISA de Ig en suero específica de H5N1 (A y B) y respuestas isotípicas de IgG1 (C y D) y IgG2b (E y F) contra H5N1 en el día 14 después de la inmunización (GMT +/- IC95) para dos dosis de antígeno diferentes: 1,5 µg (A, C y E) o 0,38 µg (B, D y F)

Fig. 9A

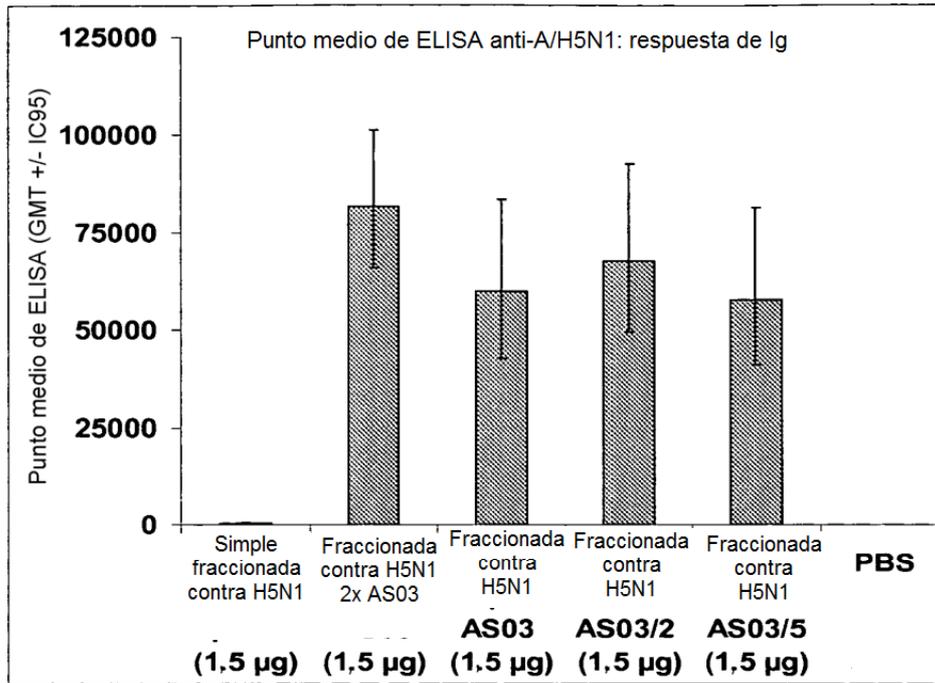


Fig. 9B

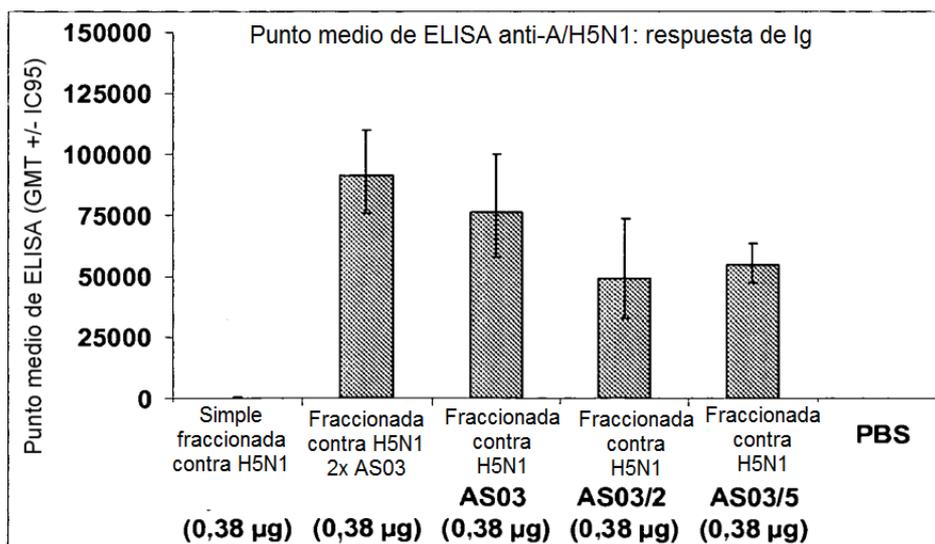


Fig. 9C

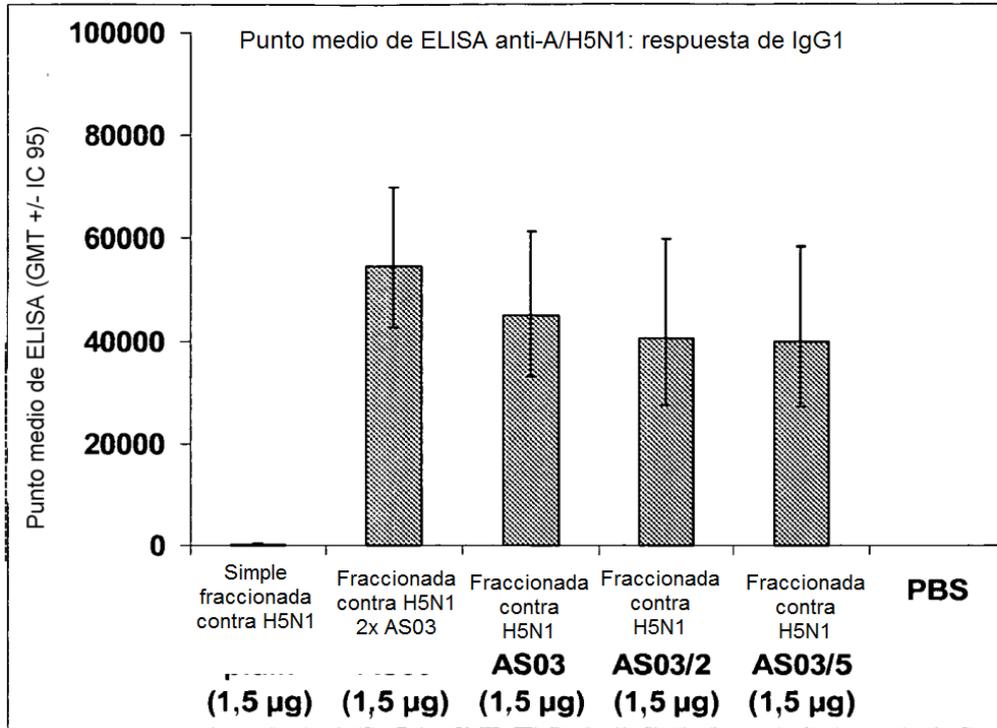


Fig. 9D

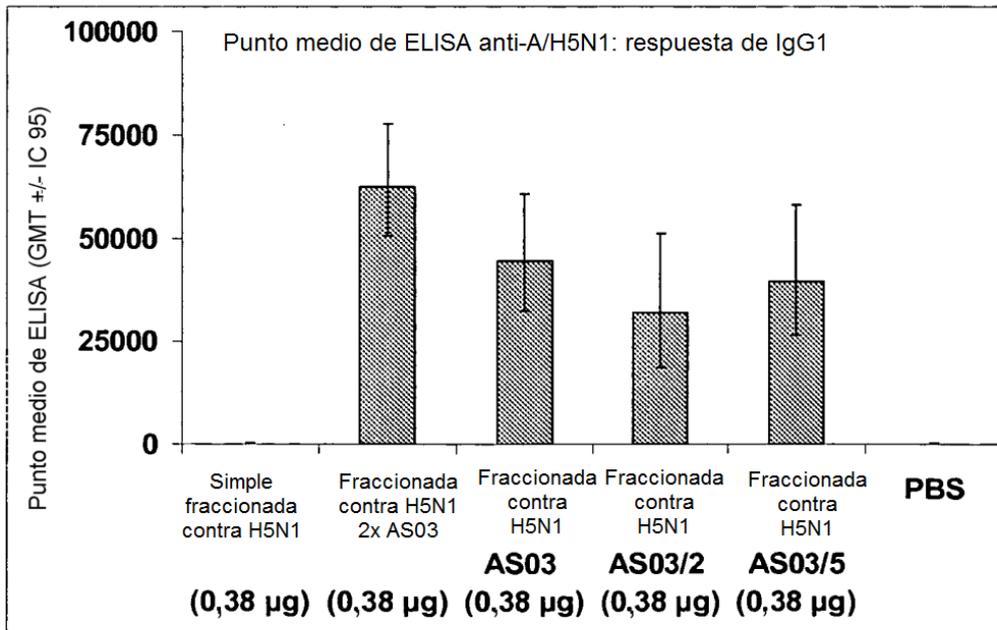


Fig. 9E

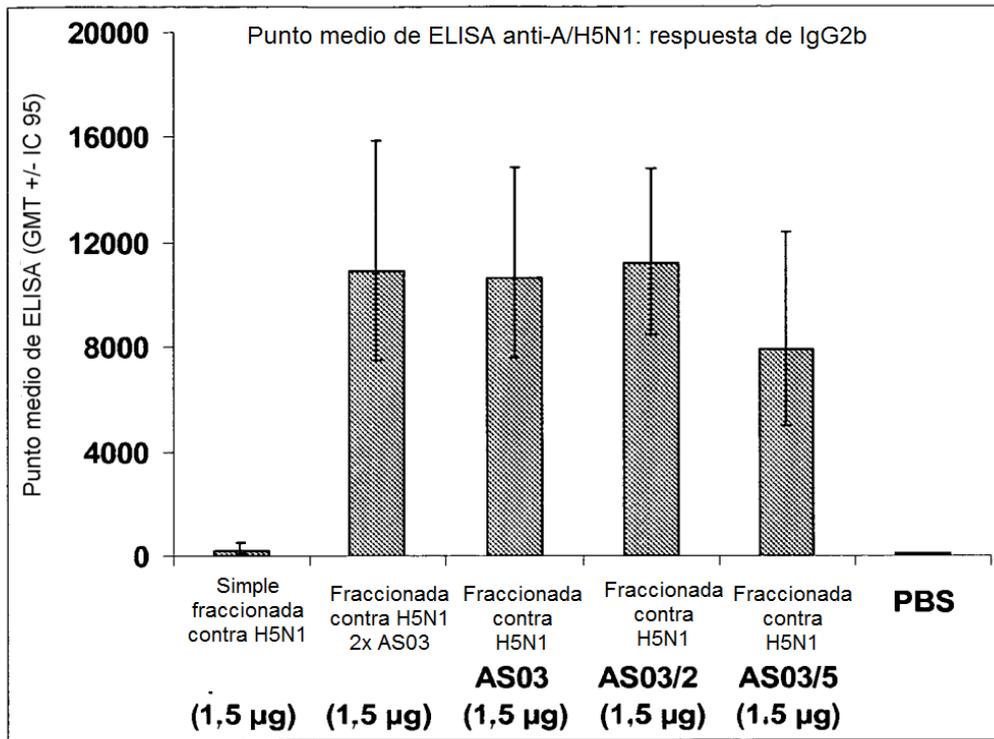


Fig. 9F

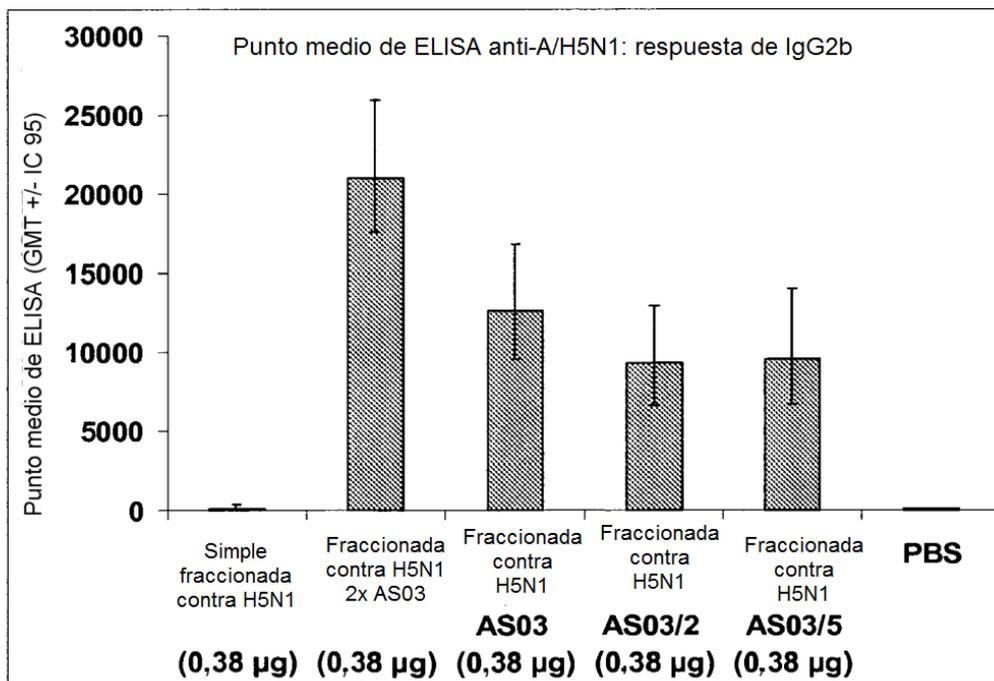


FIG.10 Prueba de inhibición de la hemaglutinación (GMT +/- IC95) en el día 21 después de la inmunización (GMT +/- IC95) para dos dosis de antígeno diferentes: 1,5 µg (A) o 0,38 µg (B).

Fig. 10A

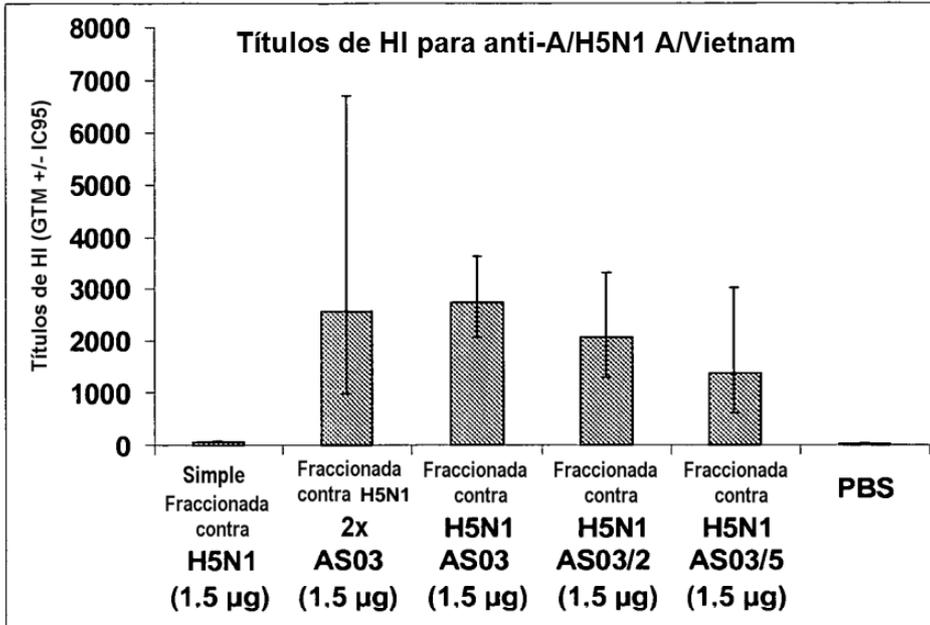


Fig. 10B

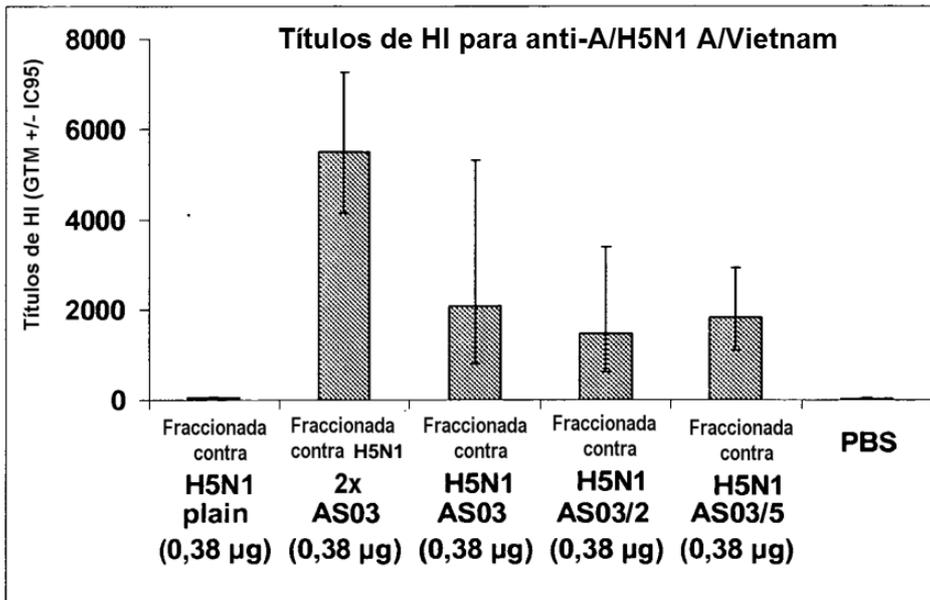


FIG. 11 Respuesta inmunitaria celular (linfocito T CD4+) en ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo inmunizados con diferentes dosis de vacuna contra H5N1 (1,5 ó 0,38 µg) adyuvantada con intervalo de dosis de AS03: (A) 1,5 µg de Ag (antígeno) de HA o (B) 0,38 µg de Ag

Fig. 11A

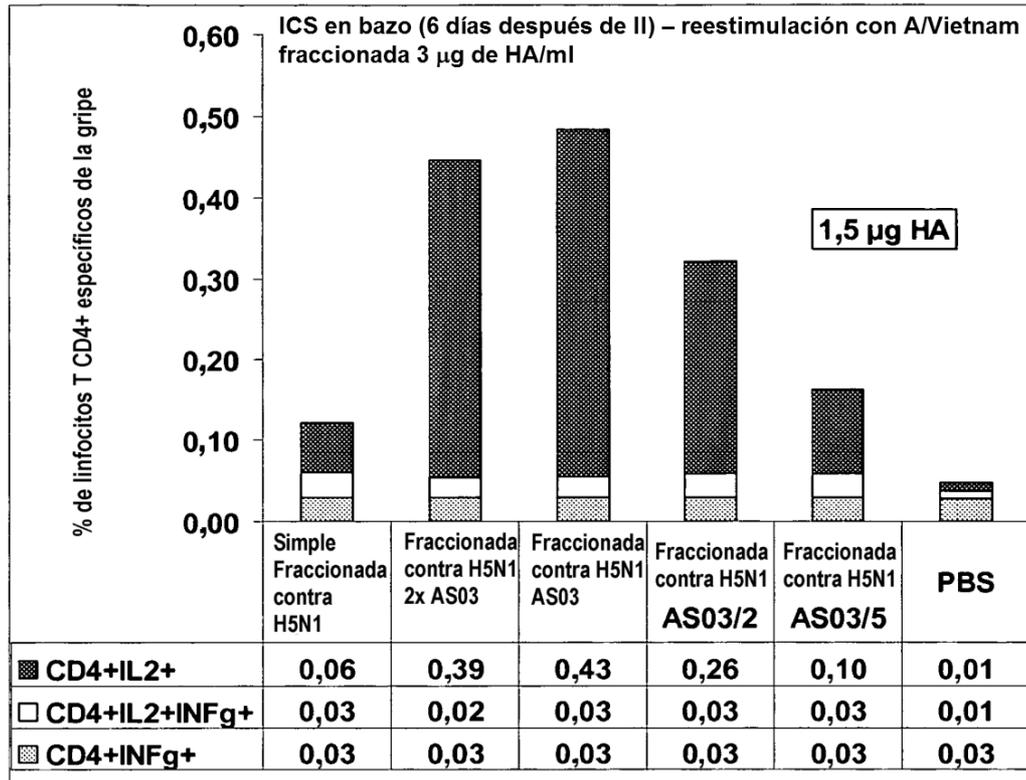


Fig. 11B

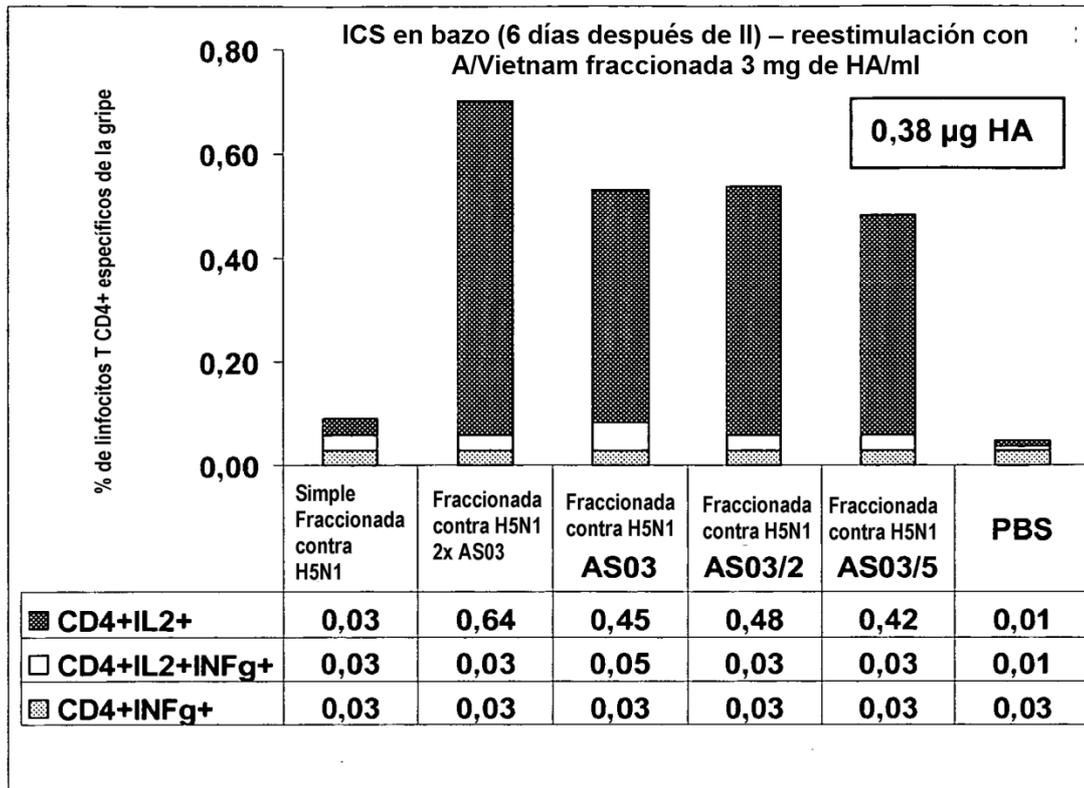
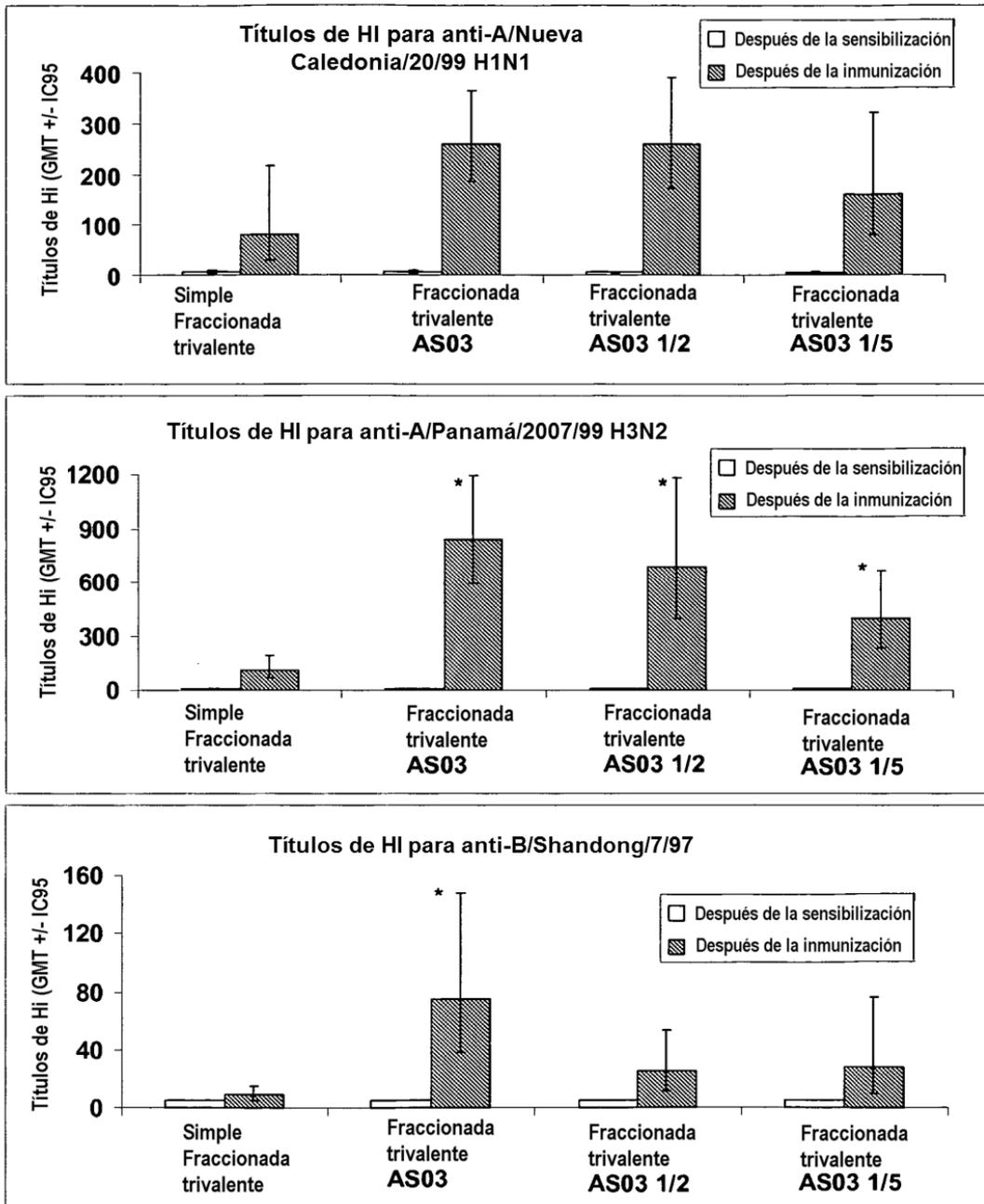


FIG. 12 Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en cerdos sensibilizados con cepas homólogas (intervalo de dosis de AS03).



* Grupo con diferencia estadísticamente significativa en comparación con la simple

FIG. 13 Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo inmunizados con TIV o QIV simple o adyuvantada con AS03 o AS03/2.

Fig. 13A - Títulos de HI para anti-B/Shandong/7/97 (virus similar a B/Victoria)

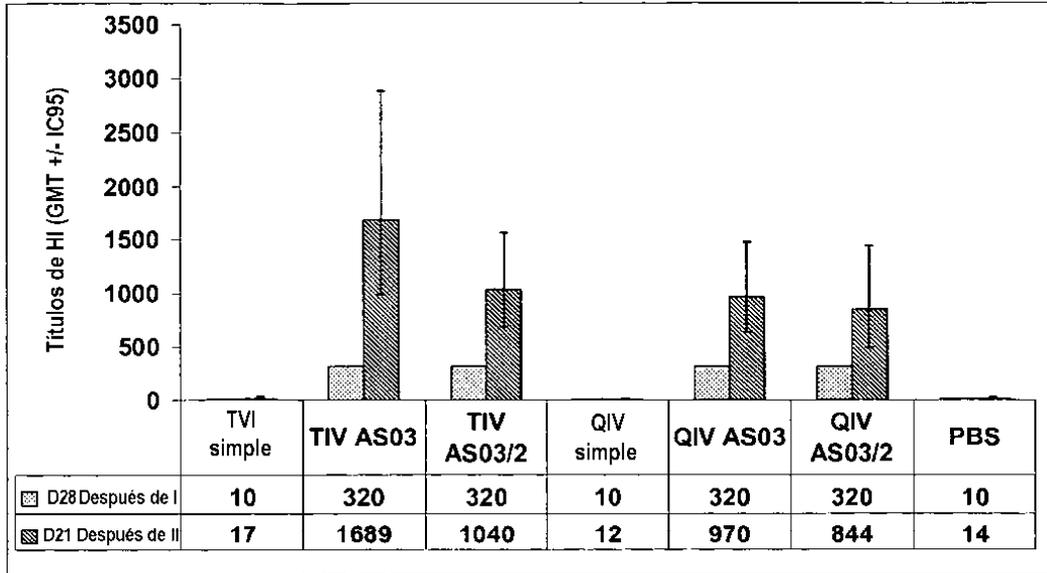


Fig. 13B - Títulos de HI para anti-B/Jiangsu/10/03 (virus similar a B/Yamagata)

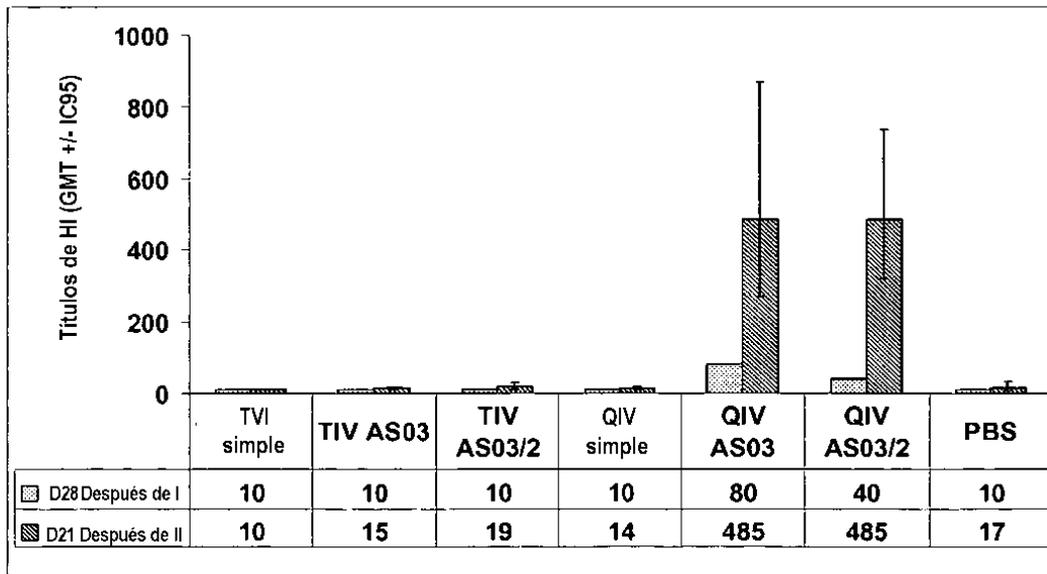


FIG. 14 Prueba de inhibición de la hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 sensibilizados con un virus similar a B/Victoria e inmunizados con TIV o QIV simple o adyuvantada con AS03 o AS03/2.

Fig. 14A - Títulos de HI para anti-B/Shandong/7/97 (virus similar a B/Victoria)

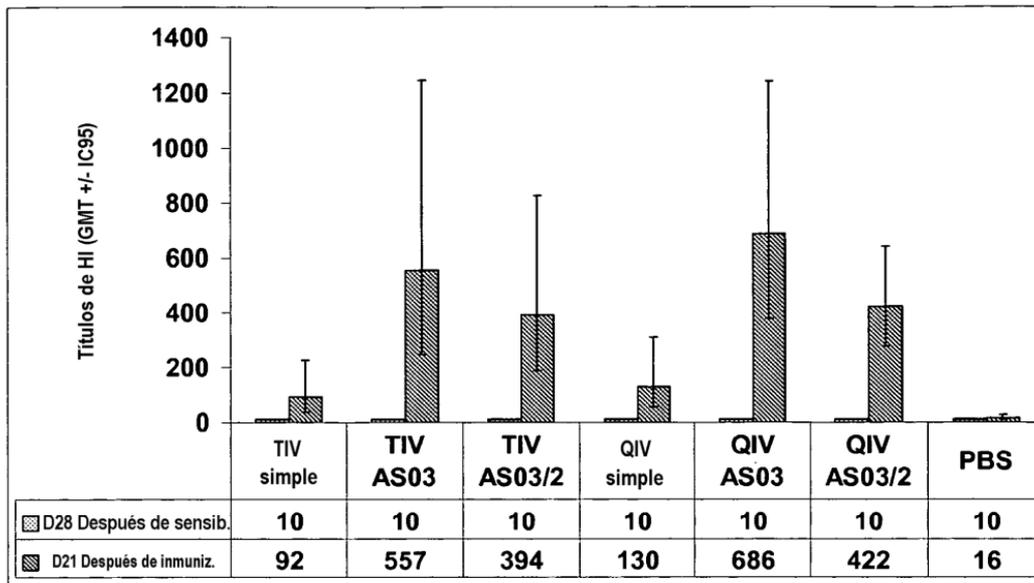


Fig. 14B - Títulos de HI para anti-B/Jiangsu/10/03 (virus similar a B/Yamagata)

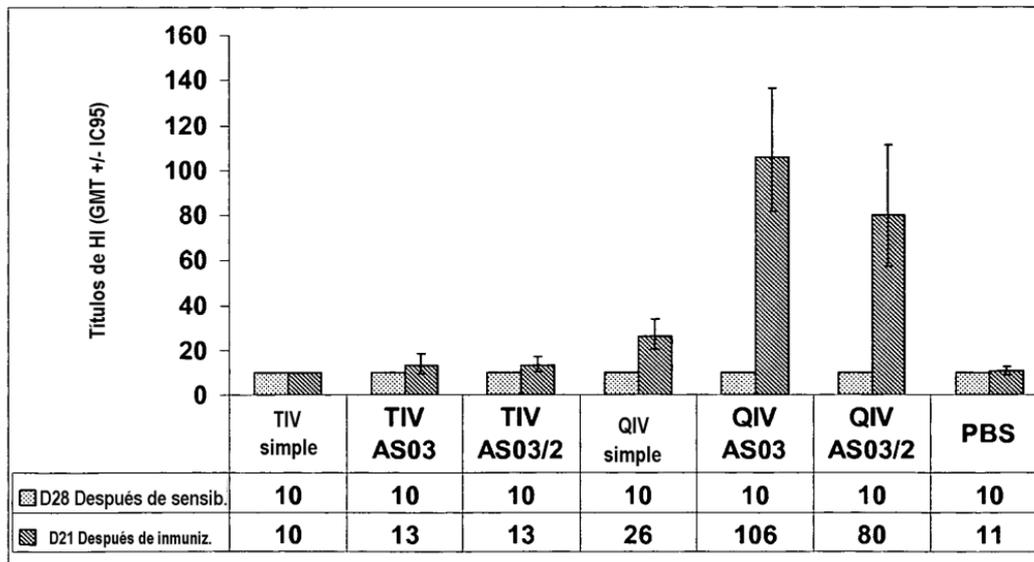


Fig. 15 - GMT para título de anticuerpos de HI en d0 y d21

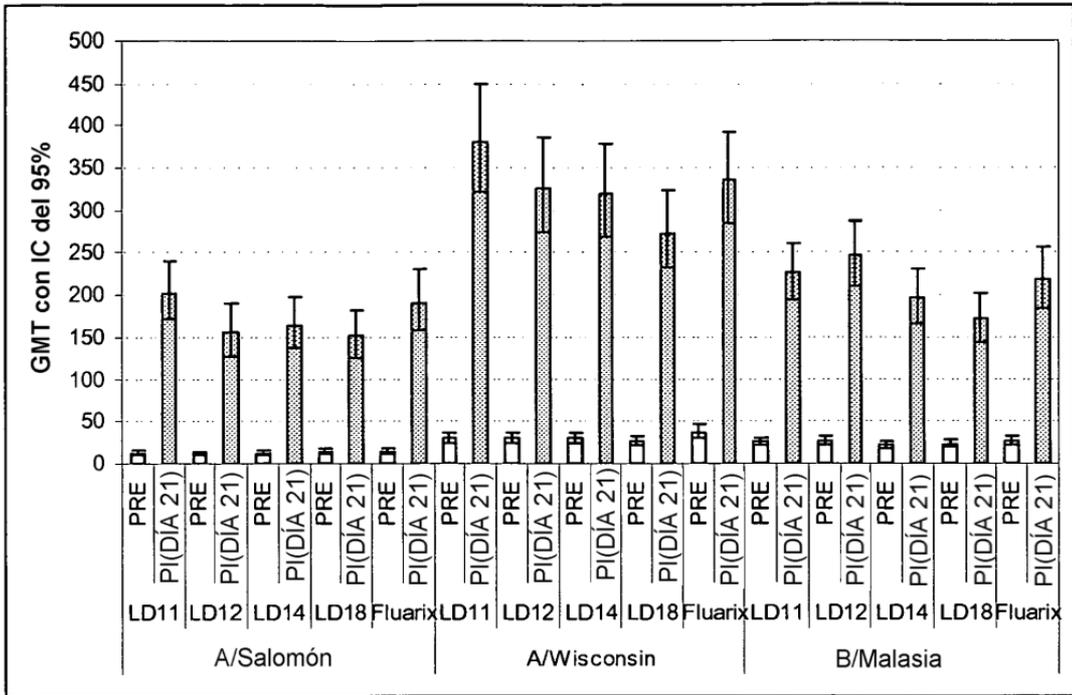


FIG. 16 - Tasas de seroprotección (SPR) para título de anticuerpos de HI en D0 y D21

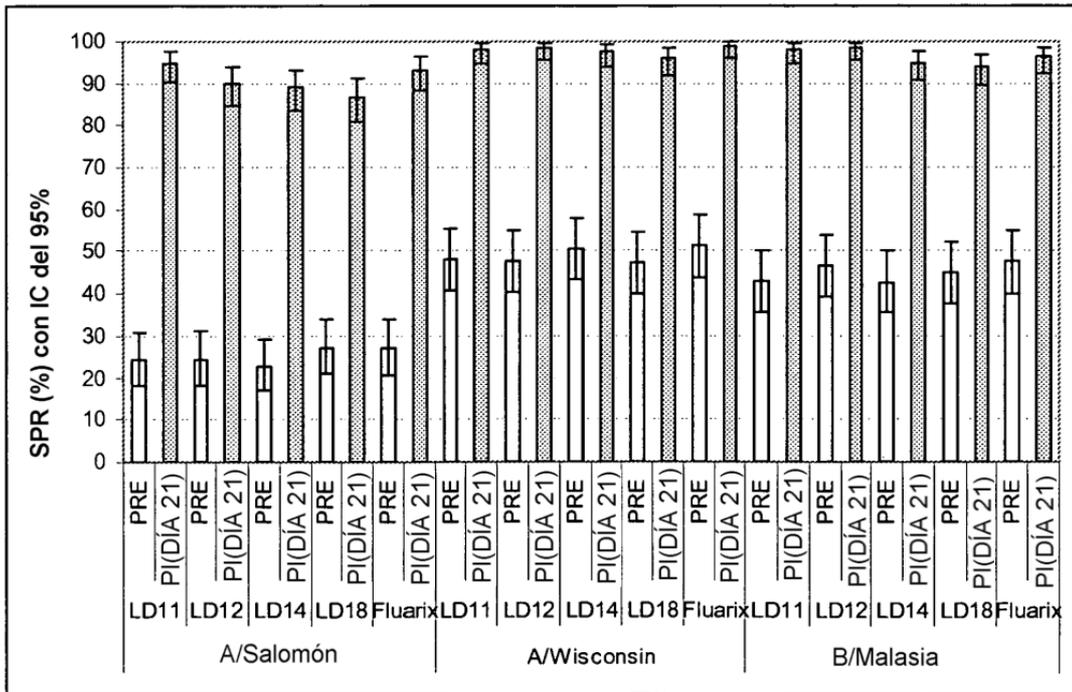


Fig. 17A - Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA21)

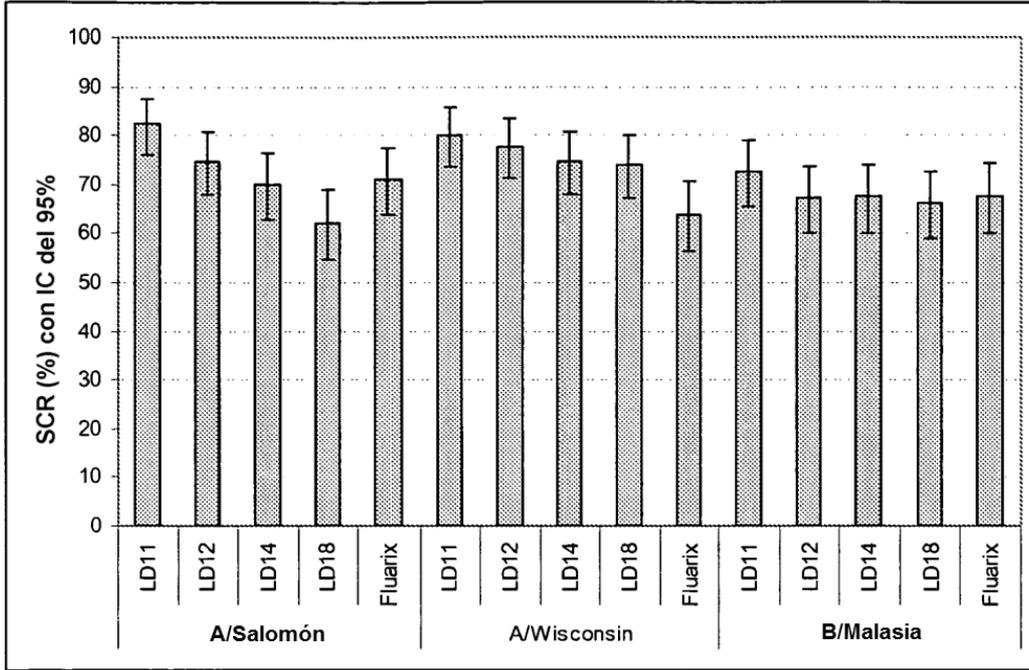


Fig. 17B - SCR para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA21) por categoría de edad

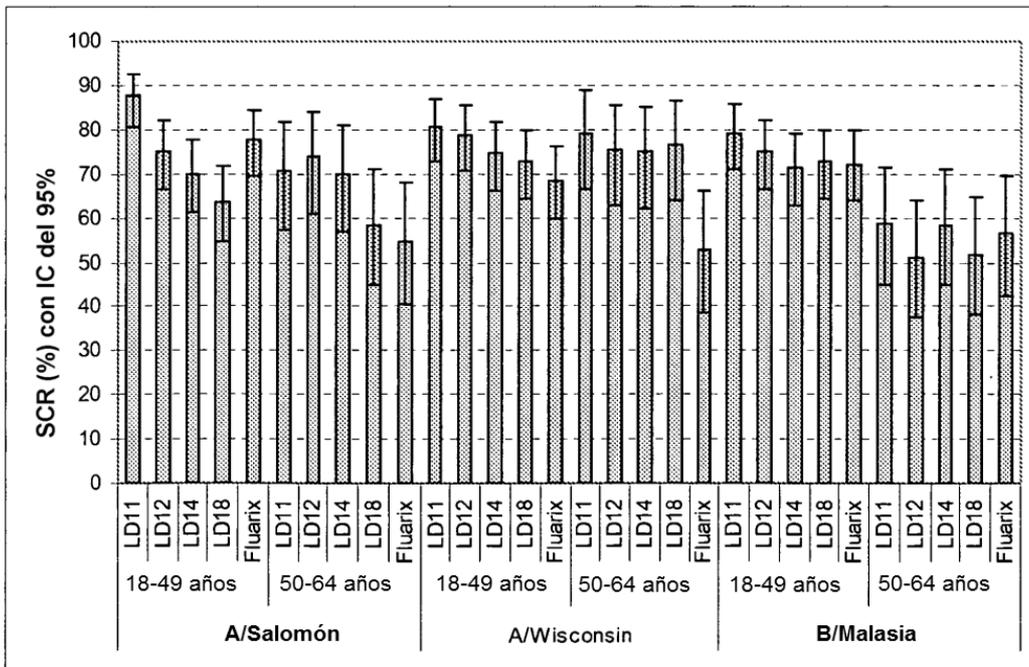


FIG. 18A - Factor de seroconversión (SCF) para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA21)

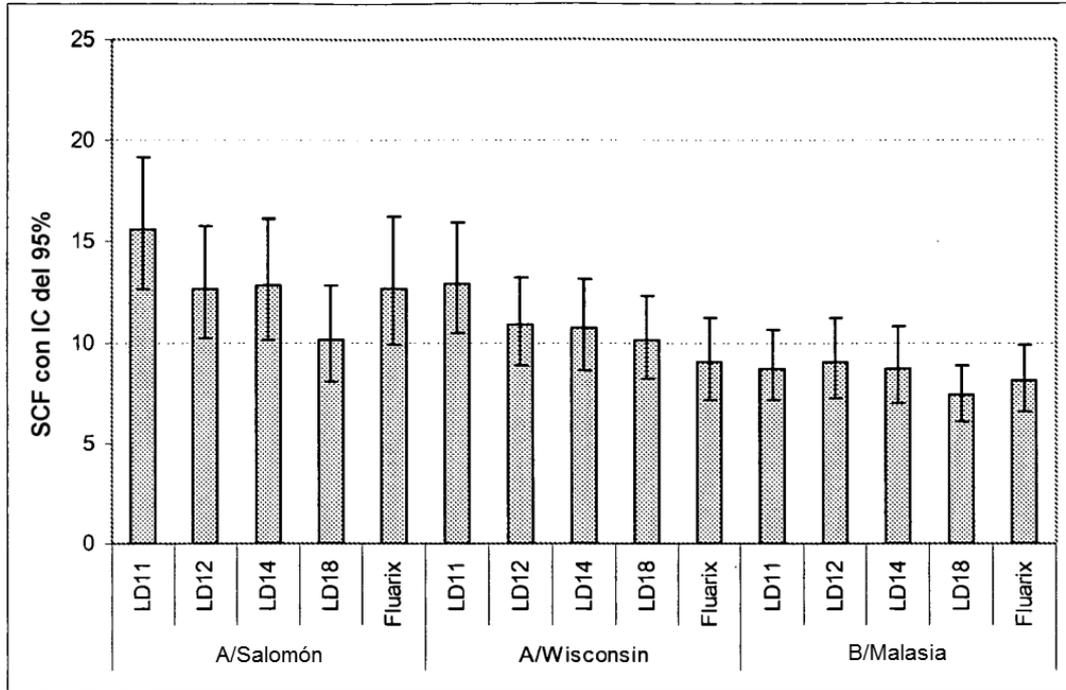


FIG. 18B - SCF para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA21) por categoría de edad

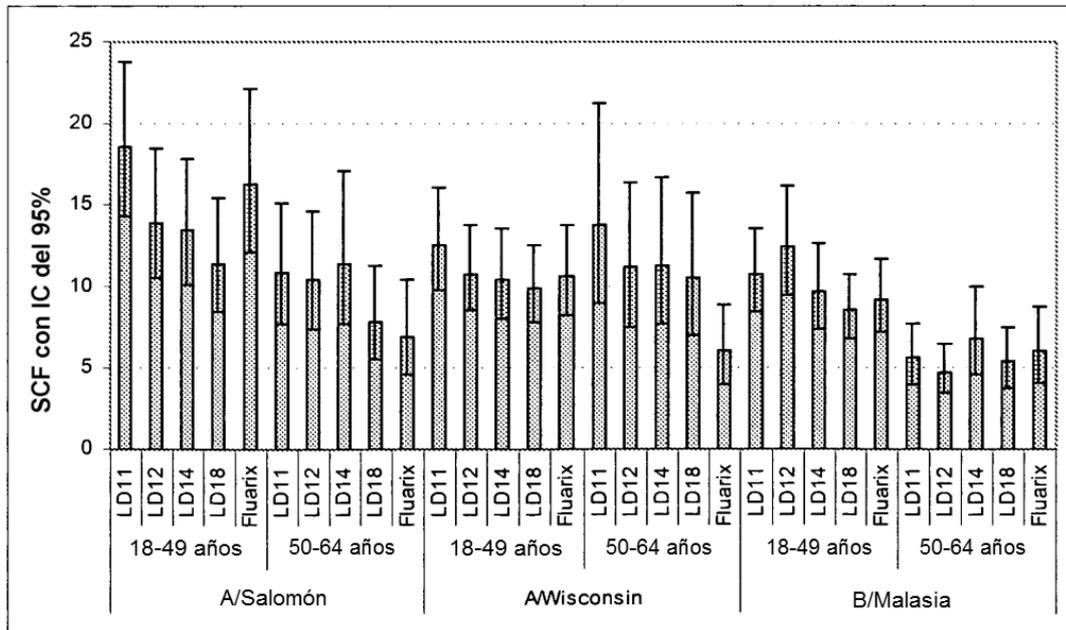
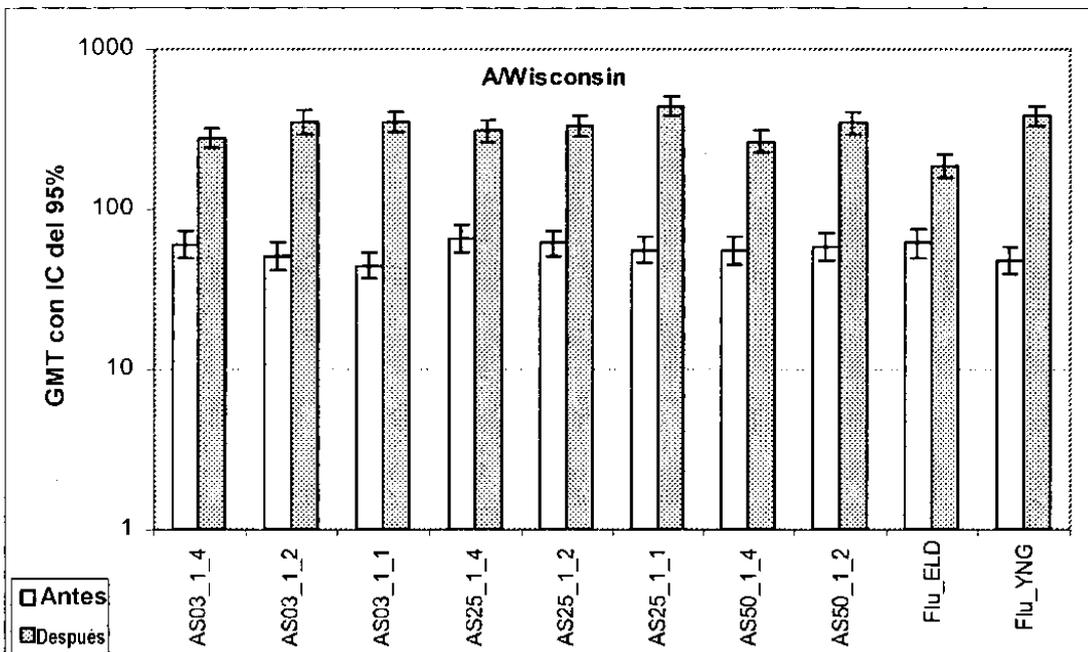
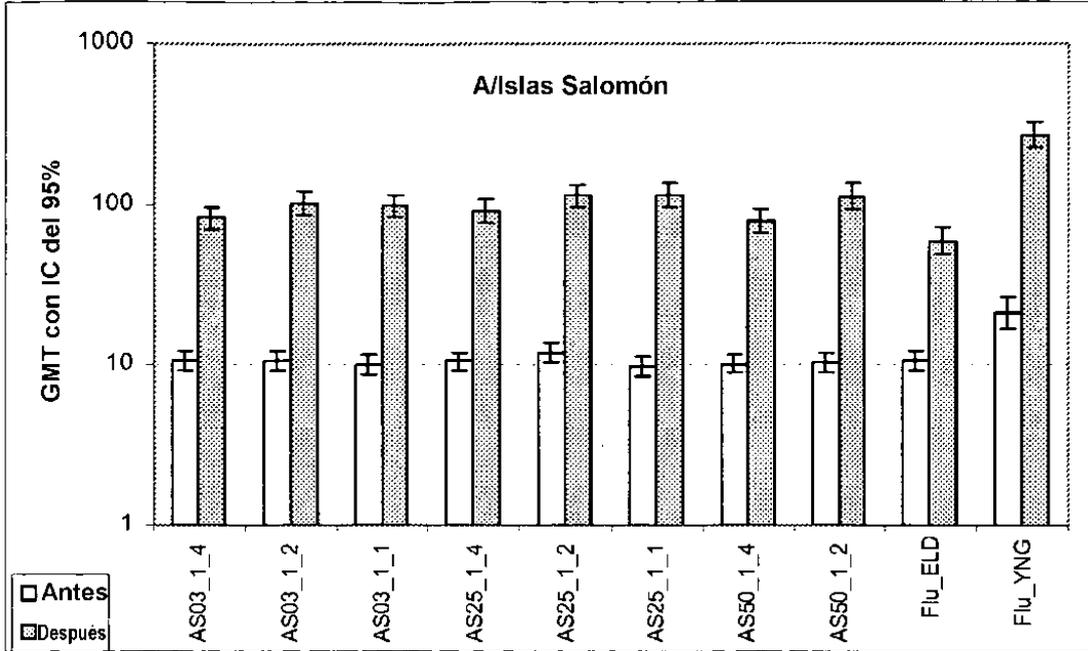


FIG. 19 - GMT para título de anticuerpos de HI en d0 y d21



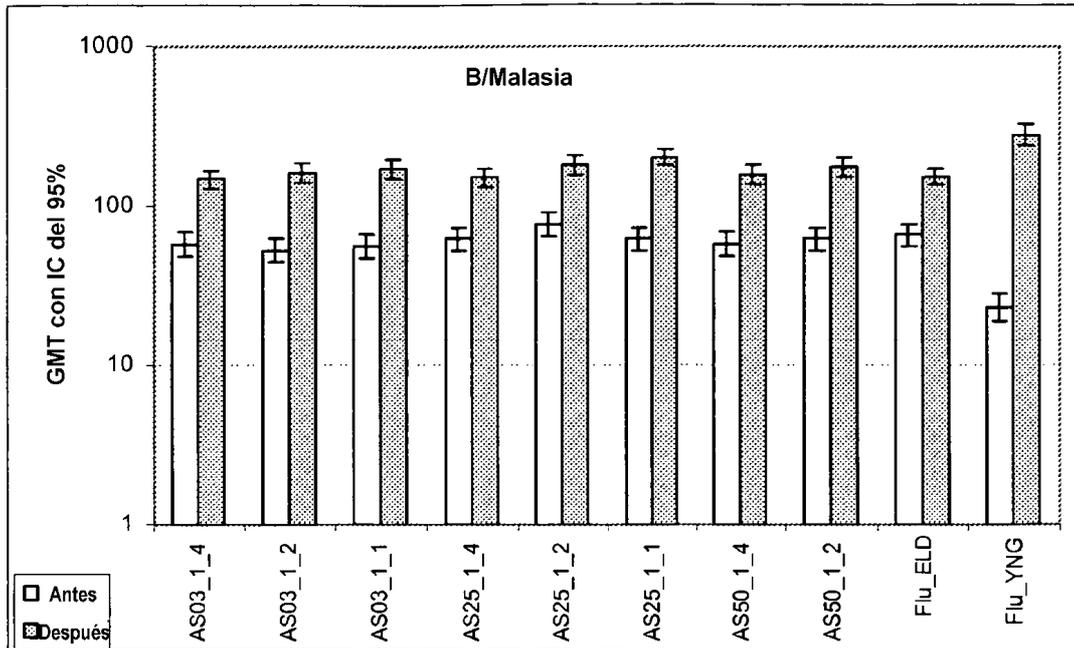
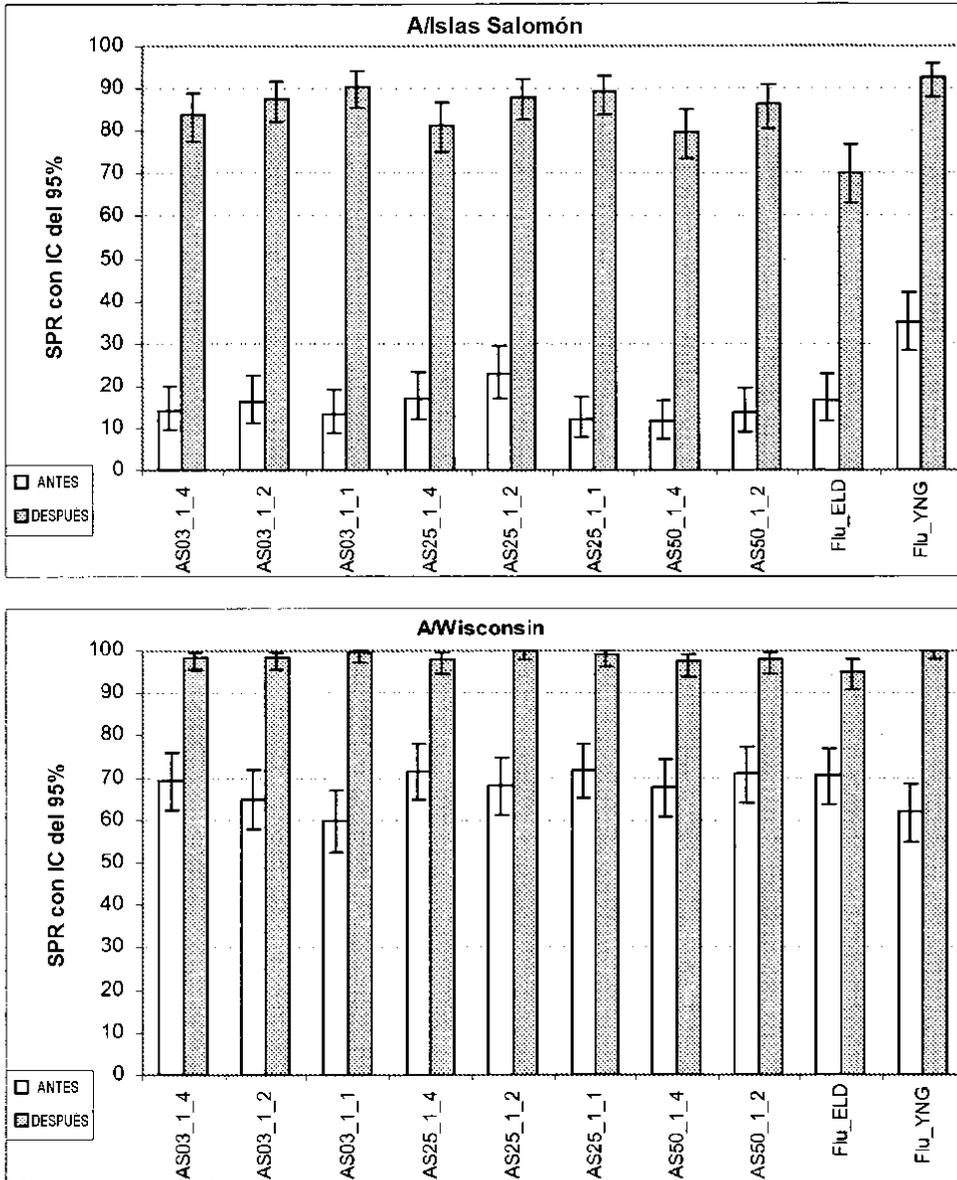


FIG. 20 - SPR para título de anticuerpos de HI con intervalo de confianza del 95% en los días 0 y 21 (cohorte de ATP para HI por inmunogenicidad)



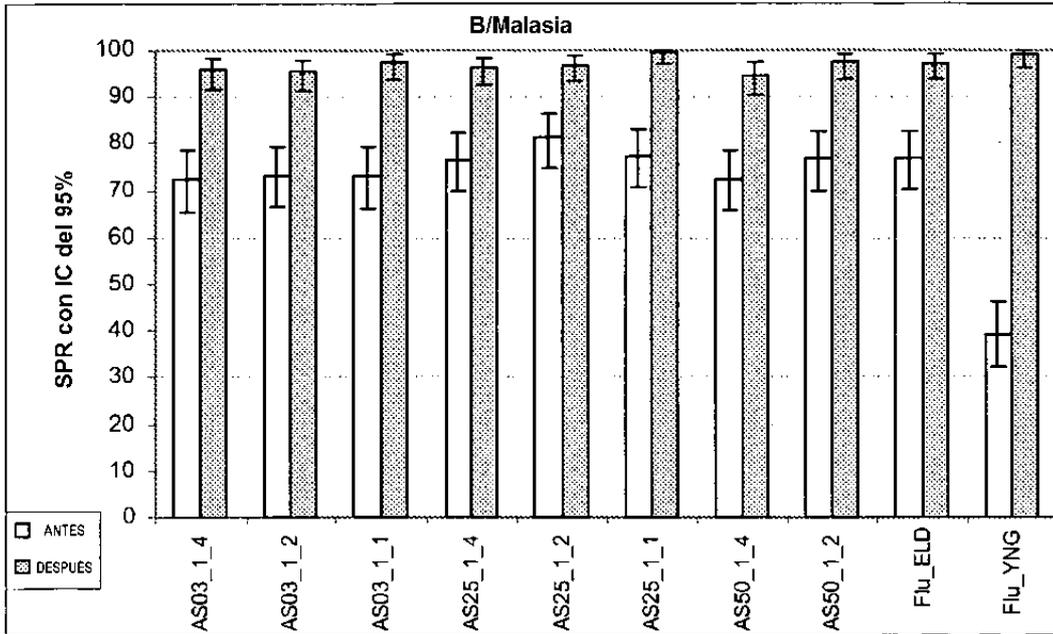


FIG. 21 - Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpos de HI en PI (DÍA21)

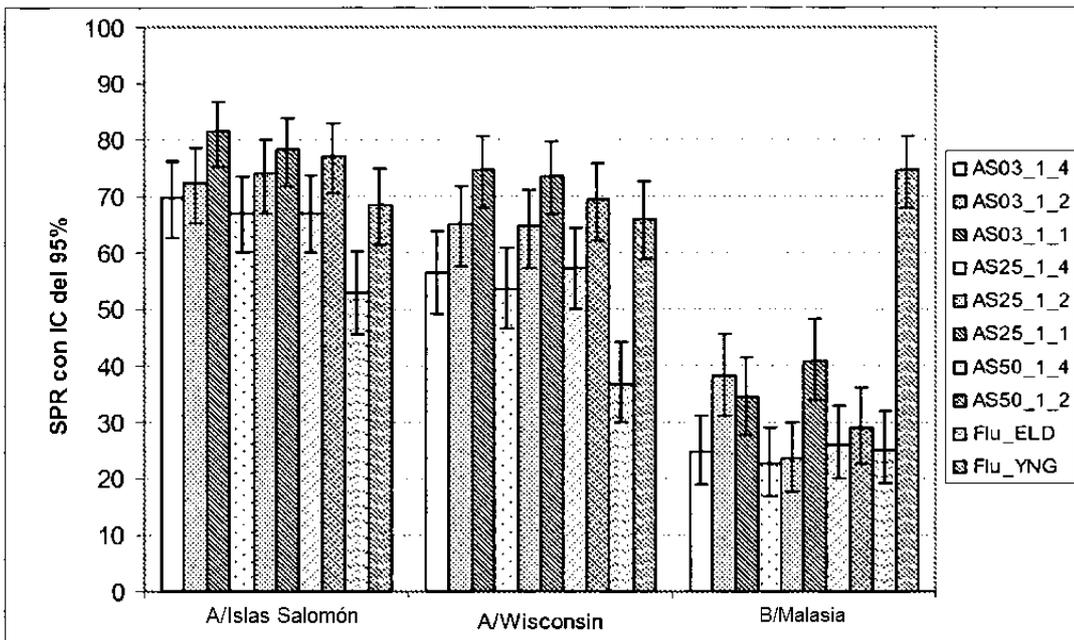


FIG. 22 - SCF para título de anticuerpos de HI con IC del 95% en el día 21 (cohorte de ATP para HI por inmunogenicidad)

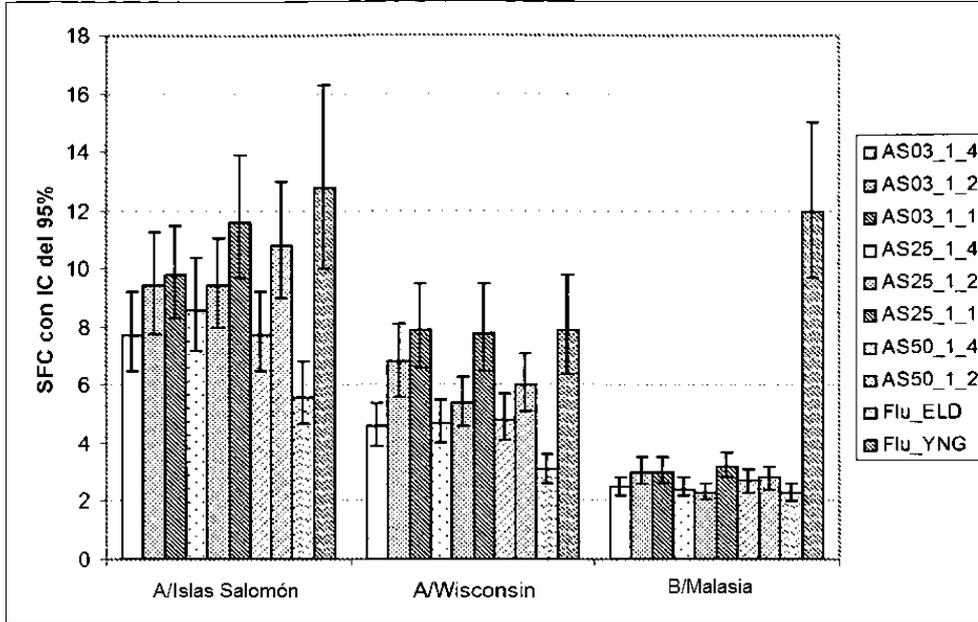


FIG. 23 – Linfocitos T CD4 positivos para citocinas para cepas reunidas en D0 y D21 (cohorte de ATP para CMI)

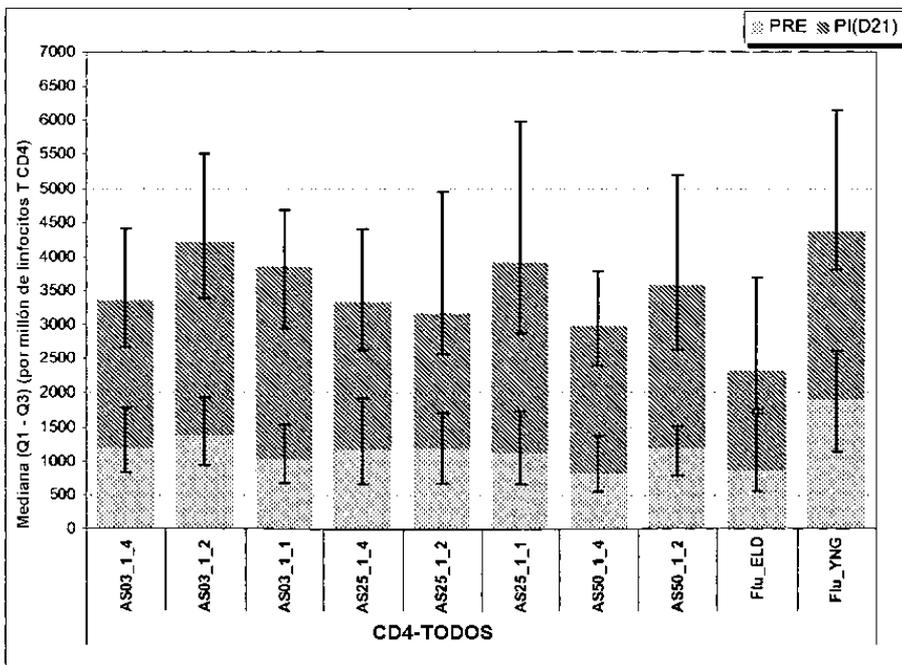


Fig. 24 - Porcentaje de sujetos que informan síntomas esperados e inesperados relacionados (todos los grados / grado 3) durante el periodo de 7 días (Días 0-6) después de la vacunación (cohorte vacunada total)

